

養殖マダイの脊椎骨異常に関する研究*¹

服 部 学

Study on the vertebral deformity in cultured red sea bream *Pagrus major*

Manabu HATTORI*²

目 次

緒 論	3
第 I 章 マダイ種苗生産における形態異常	5
第 1 節 形態異常の種類と発生率	5
1. 材料および方法	5
2. 結果	7
3. 考察	8
第 2 節 主な形態異常の骨形態	9
1. 材料および方法	9
2. 結果	9
3. 考察	12
第 II 章 短軀症の症状解析	13
1. 材料および方法	13
2. 結果	16
3. 考察	23
第 III 章 椎体欠損による短軀症の原因解析	28
第 1 節 胚発生期の低酸素処理による椎体欠損の誘導	28
1. 材料および方法	28
2. 結果	30
3. 考察	34

*¹ 本論文は近畿大学審査学位論文である。

*² 大島実験場 (Fisheries Laboratory, Kinki University, Kushimoto, Nishi-muro, Wakayama 649-3633, Japan)

第2節 胚発生期の高水温処理による影響	37
1. 材料および方法	37
2. 結果	37
3. 考察	38
第IV章 椎体欠損による短軀症の防止に向けて	40
第1節 マダイ胚発生期の酸素消費量	40
1. 材料および方法	40
2. 結果	42
3. 考察	43
第2節 胚発生期の低酸素処理濃度と処理時間	46
1. 材料および方法	46
2. 結果	48
3. 考察	54
要 約	57
Summary	59
謝 辞	61
文 献	61

緒 論

我が国において 1960 年代より始まったマダイの養殖用種苗生産^{1,2)}は、近年の生産量が年間約 6000 万尾に達し、そのすべてが人工種苗により供給されている³⁾。マダイは養殖対象魚種の中でも最も生産技術が進んでいる魚種であり、近年における種苗生産技術の向上は、マダイ種苗生産における目標を、量産化の追求から、生産効率の向上や品質改良による優良種苗の開発にシフトさせてきた⁴⁾。しかしながら、これらの目標において障害となっているのは、現在の生産技術においても少なからず発生する形態異常であり⁸⁾、このことが生産効率だけでなく販売価格の低下を招いている。供給過剰によって市場価格が低迷する現在の厳しいマダイ養殖経営の状況⁹⁾を打開するためには、形態異常の原因を解明し、その発生を防止して、効率のよい種苗生産を目指す必要がある。

形態異常の問題を解決することは、養殖経営における生産効率の向上に貢献するだけではない。近年、食品に含まれる有害物質が問題となることがあり、養殖魚を含めた食品の安全性に対する一般の関心が高まっている。養殖魚の形態異常は、たとえそれが食品としての安全性を脅かすものでないとしても、消費者に与える養殖魚のイメージダウンにつながる。そのため、形態異常の防除は安全な食品として養殖魚を消費者に提供するという養殖産業界の姿勢において重要である。また、我が国では天然水産資源の回復のため、マダイ、ヒラメおよびサケ・マス類などの多くの魚種で人工種苗放流が行われている。多くの形態異常の原因や詳しい発生の様子が明らかでない現状では、形態異常が及ぼす放流後の生残や成長に対する影響も不明である。このような理由からも、種苗の放流効果の向上のためには、形態異常の防除は重要な課題である。

国内における形態異常魚の研究は、1960 年代以前は対象がほぼ天然魚に限られ、博物学的な興味に基づいた症例報告が主であったが、1960 年代後半より、農薬などの使用の増加による大量斃死事例や形態異常例の報告が増加し始めた。これに加え、淡水・海水養殖の急激な発展に伴い、数多くの魚種において様々な種類の形態異常の報告がなされるようになり^{2,10-24)}、現在の形態異常研究は人間活動によって引き起こされる環境悪化の結果生じる問題、すなわち環境問題としての側面と、水産増養殖において防除すべき食糧生産における問題としての側面を兼ね備えるに至っている。

マダイ養殖用種苗における形態異常は、これまで福原 (1977)、北島 (1978)、隆島 (1978) や松里 (1986) によって短軀症、脊椎骨前弯症や側弯症が報告されている^{2,11,25-27)}。特に短軀症は比較的高率に発生することが知られ、マダイ以外の養殖用種苗、すなわち、イシダイ^{28,29)}、クロダイ³⁰⁾、ヒラメ³¹⁻³³⁾、ニジマス³⁴⁻³⁷⁾ およびクロマグロ³⁸⁾ など数多くの魚種で報告されている。また、フナ³⁹⁾、ウグイ⁴⁰⁾ およびヘダイ⁴¹⁾ などでは天然魚においても報告されていることから、養殖魚と天然魚の共通の課題として防除策開発が切望される症状の 1 つである。

魚類は多くの骨格を有し、形態異常の多くは骨形態の異常に起因する。骨形成異常の原因としては、遺伝的素質^{12,13,42,43)}、ビタミンやミネラルなどの栄養疾患^{18-20,24,32,33,44)}、胚発生期および仔魚期の水温^{24,40,45)}や化学物質の影響¹⁵⁻¹⁷⁾などさまざまな要因がこれまでに報告されている。しかし、魚類の骨形成異常について、その原因を特定し、発症のメカニズムを解明した例は少ない。さらに、これらの報告例のなかでも生産現場において実用的な対策を行い得るものは、鰯の形成不全

などによる脊椎骨の前湾症^{2,46-48)} およびビタミンC欠乏¹⁸⁾ による脊椎の湾曲など数例しかない。例えば、短軀症の骨症状の1つである椎体癒合の原因として、仔魚期における生物餌料への過剰なビタミンA添加^{32,33)}、および細菌感染^{36,37)}などが報告されている。しかしながら、これらの報告における症状の誘発条件は、現状の種苗の飼育方法の範囲を大きく越えるものであり、実際の生産現場においてそれらの知見を応用することは困難である、あるいは、かなり限られた条件でないと応用できないものと考えられる。

本研究では、マダイ優良種苗生産のための技術開発に資する目的で、マダイ脊椎骨異常の原因究明およびその防止策の確立を目指して研究を行った。第I章では、選別調査を実施し、現在産業規模での生産現場にて発生する種形態異常について調査し、その発生率や骨異常を明らかにした結果である。そして第II章では、主な形態異常である短軀症について詳しい診断を行い、その外部形態の特徴や骨格について骨形態学的、骨組織学的に検討した結果である。さらに第III章では、胚発生期や仔魚期に、現在の種苗生産現場で起こり得る環境変化である低酸素刺激や高水温刺激などを与えて飼育実験を行い、これらが短軀症の原因と成り得るか否かについて検討した結果である。最後に第IV章では、前章で得られた結果をもとに、短軀症の防止を目的とした具体的な対策を講じるにあたって、必要とされる基礎的な知見を集積することを目的とした研究結果である。

第 I 章 マダイ種苗生産における形態異常

現在、マダイの種苗生産は、近年の魚価の低迷からコストを削減した効率的な生産が求められている。その打開策として、形態異常の防止は、その目標達成に有効な手段の 1 つであると言える。しかし、発生する形態異常は、非常に多種多様である。したがって、形態異常の防止策を検討する前に、その発生の現状を把握し、優先的に取り組むべき課題を判断する必要がある。

これまで、マダイの種苗生産過程において、短軀症およびバグヘッドネス症などの骨異常による外部形態の異常、黒化および黄化などの体色異常、眼球や体表の外傷および病気や寄生虫などの影響による痩せた個体などは、すべて異常個体として一括して除去されてきた。そのため、特にこれらを分類して調査しない限り、種類別の発生率は不明である。

そこで本章の第 1 節では、産業規模でのマダイ種苗生産において、どのような異常がどの程度発生しているのか把握することを目的とし、選別調査を行った。そして第 2 節では、骨格形成不全による形態異常の実体を明らかにすることを目的とし、選別調査で明らかとなった多発する症状について、軟骨・硬骨二重染色法を施した透明骨格標本を用いて骨形態学的に検討した。

第 1 節 形態異常の種類とその発生率

I-1-1. 材料および方法

a) マダイ種苗の選別方法

稚魚選別には 1 次選別と 2 次選別があり、1 次選別は、大きさをそろえるための選別、2 次選別は、病魚や形態異常個体を除くための選別である。この過程を孵化後の日令とサイズを追って述べると以下ようになる。マダイ稚魚は、陸上施設で日齢約 40 日、全長 30 mm 程度まで初期飼育され、その後、海上の網生簀（6m×6m×6m）に 10 万尾ずつ収容する。収容されたマダイは、全長約 50 mm まで中間育成された後、目合 12 mm から 18 mm の網カゴを用いて小サイズを取り除く（1 次選別）。その後、全長約 70 mm に達するまで引き続き中間育成され、全長約 70 mm に達した稚魚は病魚や体色・形態異常魚が除かれ（2 次選別）、出荷するというプロセスを経る。1 次選別および 2 次選別において、成長が遅い稚魚は小として選別され、再び中間育成、2 次選別を行うという過程が繰り返し行われる（Fig. I-1-1）。

形態異常の調査方法は、現在の生産現場で行われている 2 次選別の方法と同様に行った。すなわち、全長約 70 mm に達したマダイ稚魚約 5 万尾を収容した 6×6×6m の網生簀から、小型の水槽に移動し、麻酔薬（魚類・甲殻類麻酔剤 FA100: 田辺製薬）にて麻酔後、選別台に水だもにて移動し、フィッシュカウンターで正常個体が約 1000 尾に達するまで継続して選別した（Fig. I-1-2）。

本研究での選別調査には、1999 から 2002 年の 4 年間、春季に近畿大学水産養殖種苗センター大島事業場（以下、大島事業場）で種苗生産され、和歌山県串本海域の網生簀にて中間育成し、2 度の 1 次選別を終えたマダイ稚魚（M size）を用いた。1 サイクルの生産過程（以下、Round と記す）で 1 回の選別調査を行い、1999 および 2002 年度は 3 回、2000 および 2001 年度は 2 回

行い、合計10回の選別で16202尾を用いた。

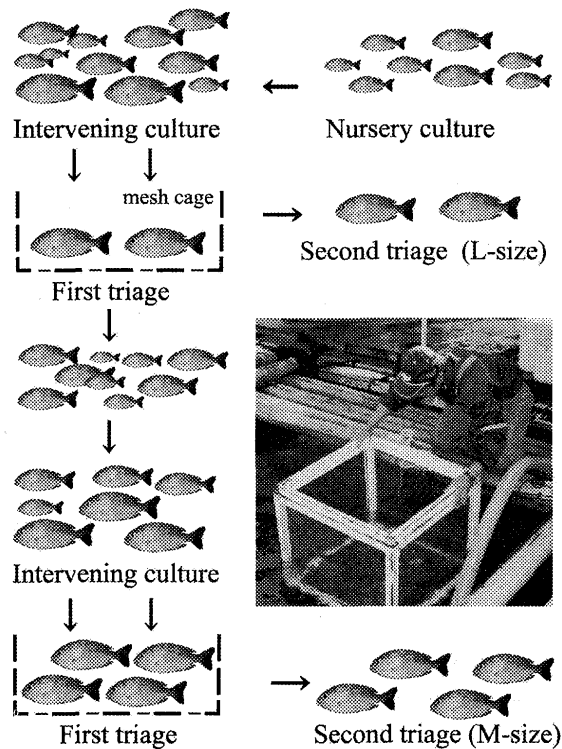


Fig. I-1-1. The process of first triage. The first triage in order to arrange size was conducted after nursery culture in fish tank on the ground and intervening culture in mesh net on the sea. The small size seedlings were triaged after intervening culture, and this process is repeated several times. The photograph shows first triage scenery.



Fig. I-1-2. The process of second triage. Anesthetized juveniles by anesthetic (FA100) were transferred belt conveyor exclusively for the fish. The external deformities such as shortened body condition and pugheadness, abnormal coloration, and injured were removed. The smaller specimens were reared again as intervening culture.

選別において、分類に使用した区分は以下の11区分とした (Fig. I-1-3)。1. 正常個体 (normal), 形態異常として, 2. 短軀症個体 (shortened body condition), 3. 頭部の形態異常 (deformity in head), 4. 背鰭担鰭骨の異常 (deformity in dorsal pterygiophores), 5. 吻部のねじれ (twist of jaw), 6. パグヘッド (pugheadness), 7. 側弯症 (scoliosis), 8. 前弯症 (lordosis), 9. その他の形態異常 (other morphological deformities), 10. 黒化や黄化などの色素異常 (abnormal coloration), 11. 眼球や体表の外傷 (injured)。

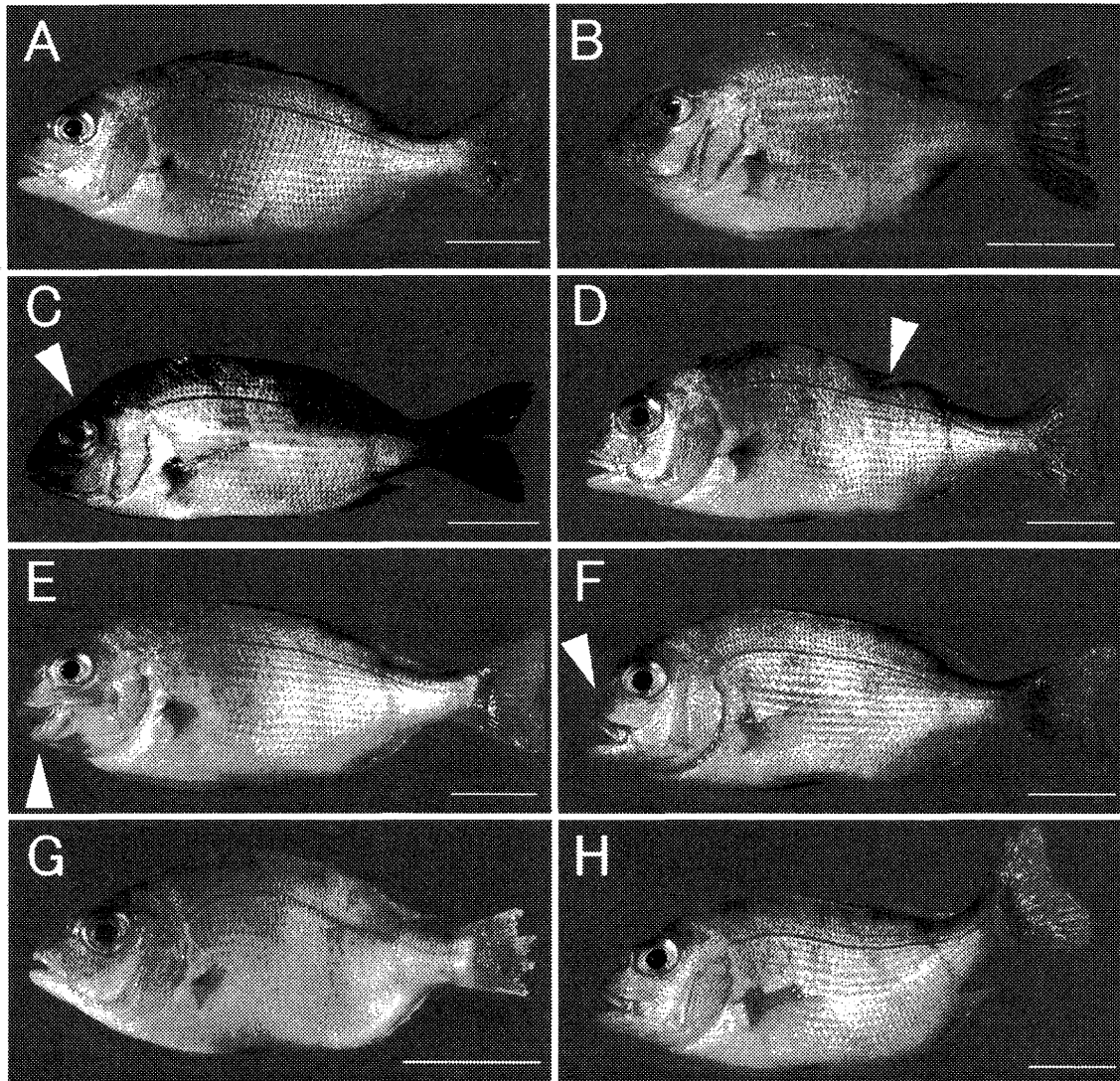


Fig. I-1-3. Examples of normal and abnormal red sea bream seedlings used for investigation. A; Normal, B; Shortened body condition, C; Deformity in head, D; Deformity in dorsal pterygiophores, E; Twist of jaw, F; Pugheadness, G; Scoliosis, H; Lordosis. Arrow heads indicate the region of deformity. Bar in all pictures indicates 2 cm.

I-1-2. 結 果

1999 から 2002 年度における短軀症の発生率は 3.54 から 7.25%とばらつきがみられるが、いずれの生産年度においても短軀症はすべての形態異常のなかで最も高率かつ恒常的に発生し、平均で 5.53%であった (Table I-1-1)。また、頭部の異常は、2000 および 2001 年度において、3.74

および2.52%発生し、短軀症に次いで高率であった。しかし、1999および2002年度では、0.14および0.06%発生し、2000および2001年度に比べ低率であった。

短軀症および頭部の異常以外の形態異常については、いずれの生産年度においても発生率が1.00%未満であり、4年間の発生率の平均は、背鰭担鰭骨の異常が0.36%、吻部のねじれが0.27%、パグヘッドネスが0.27%、側湾症が0.28%、前湾症が0.23%、眼球や体表の外傷が0.39%、黒化や黄化などの体色異常が0.27%であった。その他の異常は平均で2.24%発生しているが、このカテゴリーには、鰓の欠損および尾柄部の異常など多種多様な形態異常が含まれる。さらに、それらの多くは形態異常が複合的に発生している個体であり、単一のカテゴリーに分類できないか、または困難な個体が含まれる。また、これらの異常の多くは、2000年度を除き0.1%未満と低率であった。正常個体は2000年度を除き90%以上であった。しかし、2000年度では約80%であり、形態異常、色素異常および外傷によって選別された個体は、他の生産年度に比べ約10%高く発生していた。

Table I-1-1. The incidence of deformities in the red sea bream, *Pagrus major*, seedlings produced for 4 years from 1999 to 2002 at the Fisheries Laboratory Ohshima Experimental Station, Kinki University

The category of triage	Incidence (%)				
	1999	2000	2001	2002	Mean
Normal	90.90	80.49	91.93	90.83	88.53
Shortened body condition	4.34	7.25	3.54	7.00	5.53
Deformity in head	0.14	3.74	2.52	0.06	1.61
Deformity in dorsal pterygiophores	0.02	0.68	0.46	0.30	0.36
Twist of jaw	0.23	0.57	0.14	0.13	0.27
Pagheadness	0.79	0.16	0.00	0.13	0.27
Scoliosis	0.05	0.30	0.23	0.56	0.28
Lordosis	0.75	0.00	0.00	0.18	0.23
Other morphological deformities	1.62	5.91	1.05	0.39	2.24
Abnormal coloration	0.54	0.48	0.00	0.06	0.27
Seedling with external injury	0.63	0.42	0.14	0.37	0.39
<i>n</i> (number of production lot)	5211 (3)	4353 (2)	3378 (2)	3260 (3)	

I-1-3. 考 察

本研究では、マダイ種苗生産において、どのような形態異常がどの程度発生しているのかを把握するために選別調査を行った。その結果、すべての形態異常のなかで短軀症が最も高率に発生し、恒常的に発生していることが明らかとなった。この結果、マダイ種苗の生産効率の向上には、最も高率に発生する短軀症を防止することが有効であると言える。

1970年代初頭、マダイ養殖における主な形態異常は前湾症であり、時として、その発生率は40%以上であった⁵⁰⁾。しかし、現行のマダイ種苗生産において、前湾症はほとんど発生せず、その発生率は1%未満であった。これは、鰓の無開腔^{46,47)} および過度の遊泳行動⁴⁸⁾ といった前湾症の主な原因が特定されただけでなく、飼育水の油膜除去および飼育水表面の流速低減といった有効な手段が行われた結果である。一方、短軀症については、鹿児島水試、広島水試および三重尾鰲水試など、その他多くの研究機関にて報告され、その発生率は恒常的に0~10%であり、時として40%程度発生している。いずれの報告も、1975年および1976年と古いことや、栄養強化剤

や配合飼料の改善、選抜育種などが行われた現在の種苗の生産方法と比較するには困難な点があるが、各試験場間での発生率と本研究の選別結果における短軀症の発生率はよく一致している。したがって、ある程度問題が解決された前弯症とは異なり、これら 1970 年代の報告以降も、短軀症の明確な原因は特定されず、具体的対策がなされぬまま現在に至っていると言える。

一般的に 1 割以下の病魚や異常の発生率は低いように思われる。しかし、形態異常の場合、そうであるとは言えない。つまり、その発生率が 5~6% に達すると、選別作業の効率が著しく低下し、生産コストが著しく増加する。具体的な例で示すと、現在、大島事業場では 1 日約 10 万尾のマダイ稚魚を選別している。しかし、異常個体が 5~6% に達すると、1 日で約 5 万尾と選別の作業効率は約半分に低下し、作業日数の増加から人件費の出費につながる。さらに、選別作業の遅延による餌代、生簀設置による漁場料および異常個体の焼却処分料なども加算され、経済的影響は非常に大きいのである。したがって、種苗生産過程で最も高率に発生する短軀症を防止することは、優先的な課題と言えよう。

第 2 節 主な形態異常の骨形態

I-2-1. 材料および方法

選別調査で得られた個体は、生かしたまま大島実験場へ持ち帰り、全長約 10 cm になるまで陸上水槽で飼育し、氷水致死させた。その後、河村・細谷 (1991)⁴⁹⁾ の方法に準じ、軟骨・硬骨二重染色法を施した透明骨格標本作製し、異常部位の観察を行って正常個体の骨格と比較により骨形態を明らかにした。標本として、選別調査にて得られた正常個体および上記選別区分 4~8 の 5 種類の典型的な形態異常個体（選別区分 2 の短軀症については次章で詳しく述べる。）をそれぞれ 10 尾ずつ用いた。

I-2-2. 結 果

a) 背鰭担鰭骨の異常

正常個体は背鰭棘を 12 存在し、軟条を 10 備える。背鰭外側にみられた異常は、すべての個体において 12 番目の背鰭棘条と 1 番目の背鰭軟条との間を中心に、背鰭基底部分が脊柱方向に陥入しており、陥入している背鰭条を担う担鰭骨は著しく変形し、陥入箇所直下の神経棘および椎体においても変形がみられた (Fig. I-2-1)。一方、異常部位周辺以外において、この異常とともに特異的に併発する骨異常はみられなかった。

b) 吻部のねじれ

異常個体の左右いずれかの前上顎骨、主上顎骨および歯骨が、正常個体にくらべ著しく変形している (Fig. I-2-2)。そのため、前上顎骨および歯骨の縫合部は正中線より左右いずれかにずれている。上記の骨格の他に、角骨、後関節骨などにおいても、変形がみられたが、比較的軽微な変形であった。症状の著しい個体では舌弓先端が口腔から下方にはずれ、峽部を突出させている個体もみられた。一方、異常部位周辺以外において、この異常とともに特異的に併発する骨異常はみられなかった。

c) パグヘッド

パグヘッドネス個体の鼻骨の収縮，前頭骨前方の湾曲，篩骨および副蝶形骨の水平軸における収縮が著しく，正常個体と顕著な差が見られた。特に，篩骨は，アリザリンレッドによる硬骨染色およびアルシアンブルーによる軟骨染色において染色されず，まだ石灰化されていない類骨と考えられる部位が存在した (Fig. I-2-3-b)。また，副蝶形骨では水平方向への伸長不全の他，前部の垂直方向への著しい伸長が見られた (Fig. I-2-3-c)。

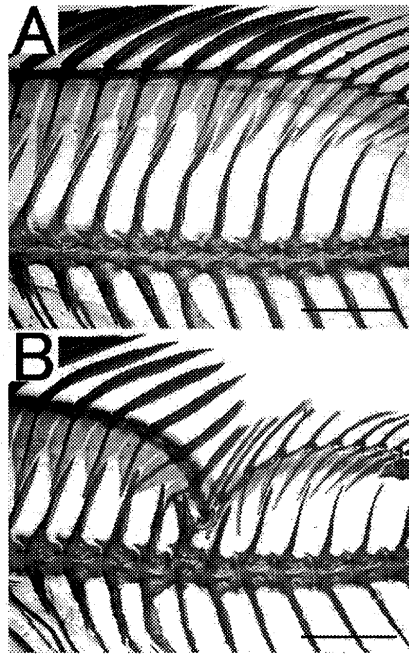


Fig. I-2-1. Transparent fish skeletal specimen stained with double staining technique. A; Normal specimen, B; Abnormal specimen. Bar in A and B indicates 5 mm.

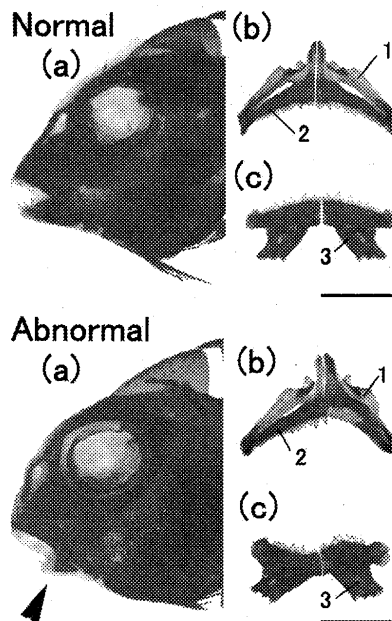


Fig. I-2-2. Transparent fish skeletal specimen stained with double staining technique. (a) ; external appearance of frontal, (b) ; upper jaw, (c) ; lower jaw. 1; maxillary, 2; premaxillary, 3; dentary. Bars indicates 5 mm.

d) 前弯症および側弯症

脊椎前弯症については、10 個体中 9 個体で、第 8～第 9 椎体を中心に V 字型に屈曲していた (Fig. I-2-4-B)。屈曲部位の椎体は、単一の場合は凹状に変形し、または、複数椎体の場合は、隣接する 2 つの椎体が台形状に変形していた。また、軟 X 線検査により、それら多くの個体は無鰓または開腔不全であり、正常な鰓を持つ個体はごくまれであった。

側弯症については、脊柱が水平方向だけでなく、垂直方向にも屈曲していた (Fig. I-2-4-C)。多くの場合、屈曲が 3 箇所で見えており、ゆるやかな M 字状を呈していた。また、軟 X 線調査では、10 検体中 5 個体が開腔不全であった。

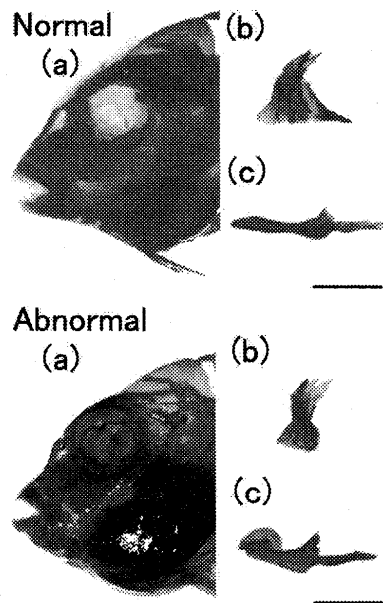


Fig. I-2-3. Transparent fish skeletal specimen stained with double staining technique. (a) : appearance of the head, (b) : Ethmoid, (c) : Parasphenoid. Bar indicates 1 cm.

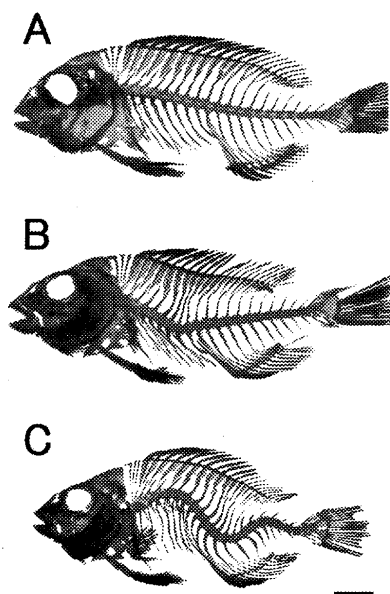


Fig. I-2-4. Transparent fish skeletal specimen stained with double staining technique. A; Normal, B; Lordosis, C; Scoliosis. Bar indicates 1 cm.

2-3. 考 察

短軀症以外の症状について、背鰭担鰭骨の異常、吻部のねじれおよびパグヘッドは、短軀症や脊椎前弯症、側弯症に比べ発生率が低いためか、発生例として報告⁵¹⁻⁵³⁾はあるものの、生産規模での具体的な数値による報告はきわめて少なく、原因や発生のメカニズムまで言及しているものは見あたらない。しかし、いずれの報告においても、症状はほぼ類似しており、これらは同様の原因によって発生しているものと考えられる。一方、吻部のねじれは、大島事業場ではシマアジの養殖用種苗で高率で発生することがあり、また、頭部の形態異常はブリやカンパチで高率で発生する(服部未発表)。したがって、魚種間で発生する形態異常の種類は大きく異なることが考えられるが、これについては今後、他魚種での選別調査が望まれる。

近年のマダイ養殖においては生産業者間の競争が激しく、マダイ稚魚の品質向上を厳しく追求する必要がある、これまで以上に選別の基準は厳しくなりつつある。そのため、生産現場では本研究での11選別の区分よりさらに多種類の選別区分が設けられている。しかし、現在のところ、正常個体と異常個体の選別の基準は、数値化した客観的なものでなく、経験によって設けられた基準であるため、選別を行う者によって基準が異なることがあり、それが問題となっている。特に、形態異常が軽微な個体を多く含む場合の選別では、選別基準の設定の仕方によって異常の発生率が大きく変化する可能性が考えられる。また、症状の詳しい分析がなされていないため、同じ症状の異常にも関わらず異なる区分で選別したり、逆に、異なる症状の異常にも関わらず同じ区分で選別したりする場合が見受けられる。したがって、防止策が未開発でこれを講じることができない現状では、客観的な数値による選別基準の確立が必要であると同時に、原因解明を目指して、発生する形態異常ごとに詳細な分析を行い、さらには、それらの症状が多発した時の飼育環境や餌料などの情報蓄積が必要であると思われる。

第Ⅱ章 短軀症の症状解析

前章における選別調査において、短軀症は形態異常のなかで最も高率に発生することが明らかとなった。したがって、マダイ種苗生産の生産効率を高めるためには、短軀症の発生防止が有効な手段であると言える。そこで、本節では、短軀症の原因解明の最初のステップとして、その症状を詳しく解析することを目的とし、外部形態の比較、軟X線画像による診断、血液検査、および硬組織切片を作成しての組織学的診断を用い、短軀症を詳しく分析した。

Ⅱ-1. 材料および方法

a) 外部形態の比較

現行の形態異常の選別は、明確な数値基準を用いた選別ではなく、経験的な判断により正常と異常が判別されている。そこで、短軀症個体はどのような外部形態をしているのかを知るため、正常個体との外部形態の比較を行った。前章の選別調査で得られた短軀症個体および正常個体を生かしたまま近畿大学水産研究所大島実験場（以下、大島実験場と略す）へ持ち帰り、陸上水槽で飼育した。全長約 10 cm に達した個体を氷水致死させた後、外部形態を測定した。外部形態としての体長（Standard length; SL）、体高（Body Height; BH）、および頭長（Head Length; HL）は市販のノギスを用いて測定し（Fig. II-1）、SL から HL を差し引いた長さ（TCPL）に対する BH の逆数（TCPL/BH）、TCPL に対する HL の逆数（TCPL/HL）、BH に対する HL の逆数（BH/HL）を算出して正常個体と短軀症個体との比較を行った。標本として、正常個体 100 尾（ 8.72 ± 0.30 cm SL）、短軀症個体 227 尾（ 8.31 ± 0.44 cm SL）を用いた。

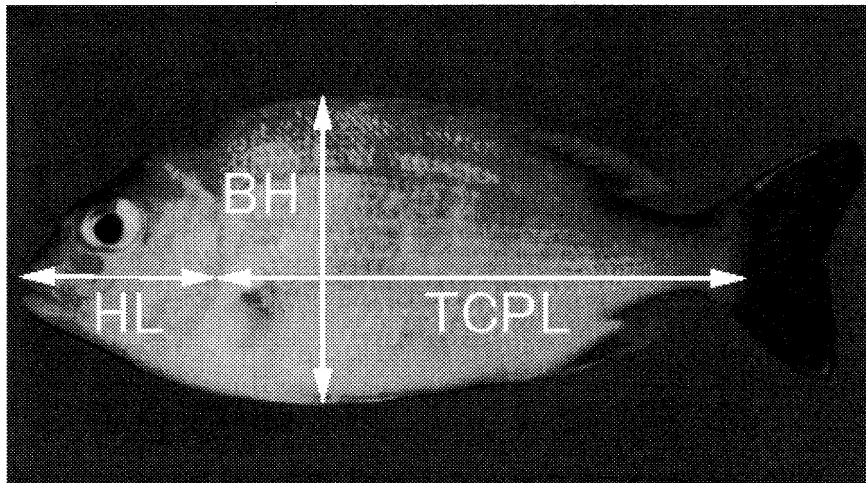


Fig. II-1. Measurements for in morphometry of external appearance. BH; Body height, HL; Head length, TCPL; standard length excluding head length.

b) 軟X線画像による診断

軟X線撮影には軟X線撮影装置（TYPE SRO-M50, ソフロン株式会社）を用い、40 kVp, 5 A, 20 秒の放射線強度で撮影を行った。また、画像フィルムには X-RAY フィルム（X-RAY Film IX FR, 富士写真フィルム株式会社）を用いた。

b-1. 脊椎骨異常の分類

短軀症における脊椎異常を把握するため、軟X線撮影画像診断により、短軀症個体の脊椎骨に見られた症状を以下の5つのカテゴリーに分類し、各症状の発生率を調べた。症状のカテゴリーは、1；脊椎骨に椎体の欠損のみがみられた個体、2；脊椎骨に短縮椎体のみがみられた個体、3；脊椎骨に前弯症のみがみられた個体、4；脊椎骨に複数の骨異常の合併症がみられた個体、5；正常な個体の5項目とした。以下にそれぞれのカテゴリーの詳細を示した。標本として、外部形態の測定に用いた正常個体100尾および短軀症個体227尾を供試した。

カテゴリー1の例；この個体は、第7, 8, 9および10椎体に異常がみられる。これら異常な椎体は1つの椎体に2つの神経棘と血管棘が付随している (Fig. II-2-B)。このような椎体のみがみられる個体を椎体の欠損として1に分類した。

カテゴリー2の例；この個体の脊椎骨はすべての椎体において、正常個体 (Fig. II-2-A) の椎体に比べ椎体の長さが短く、直径が小さい (Fig. II-2-C)。このような椎体のみがみられる個体を2に分類した。

カテゴリー3の例；この個体の脊椎骨は、体軸に対して垂直方向に弯曲している (Fig. II-2-D)。脊椎骨のみがみられる個体を3に分類した。

カテゴリー4の例；上記3種の脊椎骨の異常などを含む複数の異常が合併してみられる個体を4に分類した (Fig. II-2-E)。

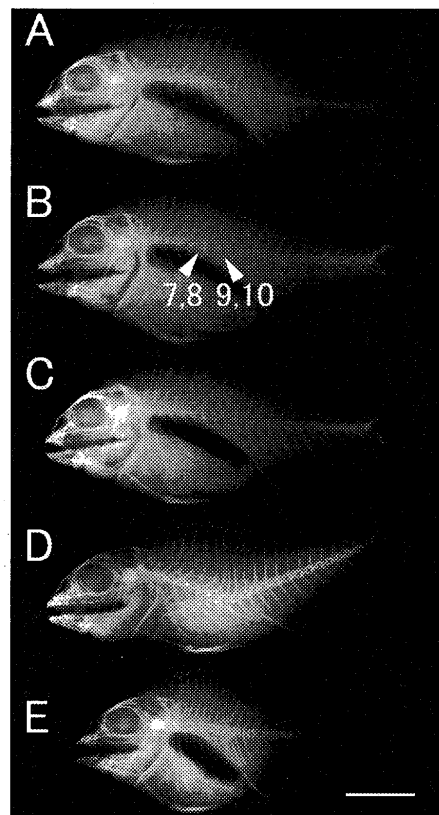


Fig. II-2. X-ray photographs of red sea bream (*Pagrus major*) seedlings. A; Normal, B; Shortened body condition due to the centrum defects, C; Shortened body condition due to the undersized centra, D; Shortened body condition due to the lordosis, E; Shortened body condition due to the centrum defects and undersized centra. Bar indicates 2 cm. Arrow heads indicate centrum defects, the numbers indicate vertebral number.

b-2. 椎体欠損の発生部位および頻度

供試個体（140尾， 78.1 ± 3.6 mm BL）の軟X線画像により，椎体欠損の発生部位と頻度を調べた。椎体欠損の部位の特定については，例えば，Fig. II-2-Bにおいて，頭部方向から数えて7および8番目の椎体に椎体が欠損している。しかし，第7または第8椎体および第9または第10椎体のどちらが異常であるのか不明であるため，第7から第10椎体を異常とみなし計数した。

b-3. 短縮椎体の判別

短軀症における脊椎骨異常において，椎体欠損に次いで多く見られた症状は，個々の椎体が短縮した個体（Fig. II-2-C）であり，脊椎骨全体にわたって短縮椎体が発生していた。この症状は，明らかに椎体形状が正常椎体と異なる。しかしながら，短縮の程度はそれほど大きくないため，椎体欠損のように正常椎体と異常椎体の判別が容易ではない。そこで，椎体の形状にある一定の数値基準を設けて短縮椎体と正常椎体とを判別した。短縮椎体の判別には，第2椎体から第23椎体までの椎体長の総和（TCL）および椎体径の総和（TCD）に対するBHの逆数（ TCL/BH ， TCD/BH ）を算出しその値により決定した。

椎体長および椎体径の計測では，供試個体の軟X線画像をスキャナ（LS-1000，ニコン株式会社）でパーソナルコンピュータに取り込み，画像解析ソフト（Scion Image version 4.02, Scion Co Ltd.）を用いて第2椎体から第23椎体までの椎体長（L）および椎体径（D）を計測した（Fig. II-3）。第1椎体は側面から撮影した軟X線像では，構造上，後頭骨と重なり，測定が困難であったため除外した。標本として，正常個体50尾（ 84.3 ± 2.9 mm SL），短軀症個体50尾（ 83.7 ± 0.3 mm SL）の軟X線画像を用いた。

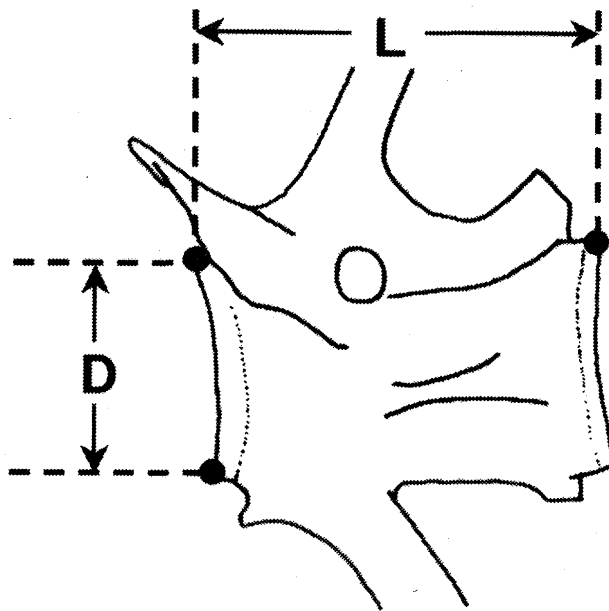


Fig. II-3. Sagittal view of the 14th centrum of red sea bream, *Pagrus major*, seedling. L, longitudinal length of centrum upper edge; D, diameter of centrum frontal edge.

b-4. 短縮椎体の発生部位および短縮率

短縮椎体の短縮率は，正常個体の椎体長および椎体径を基準とし，b-3より短縮椎体であると判別された個体の椎体径および椎体長を測定し，正常椎体に対する短縮椎体の割合を算出した。

標本として、正常個体 42 尾 (84.1 ± 2.3 mm SL), 短軀症個体 38 尾 (81.9 ± 0.7 mm SL) を用いた。

b-5. その他の骨異常

短軀症個体において脊椎骨の異常と共に発症していた症状について発生率を求め椎体欠損や短縮椎体との関連性を調査した。標本として、外部形態の測定に用いた正常個体 100 尾および短軀症個体 227 尾の軟 X 線画像を用いた。

c) 異常脊椎骨の外部および内部形態

c-1. 脊椎骨外部形態の観察

軟 X 線画像による診断では細部の椎体形状を明確に把握が不十分であるため、軟骨・硬骨二重染色法による透明骨格標本作製し、正常椎体と異常椎体の差違を形態学的に検討した。透明骨格標本の作製方法は河村・細谷 (1991)⁴⁹⁾ に準じた。

c-2. 椎体内部形態の観察

異常椎体の内部構造および咽頭骨を観察するため、脱灰硬組織切片を作成し、正常個体の椎体および咽頭骨と比較した。正常個体 10 尾 (80.0 ± 0.5 mm BL) および椎体欠損と短縮椎体による短軀症個体 20 尾 (80.5 ± 0.0 mm BL) は、10% 中性緩衝ホルマリンで固定した後、キレート剤 (EDTA-2Na) を用いて脱灰を行った。脱灰処理した標本はパラフィン包埋し、ミクロトーム (RM2165, Leica Microsystem) を用いて横断面および縦断面に $5 \sim 7 \mu\text{m}$ で薄切した後 HE 染色し、光学顕微鏡 (BH-2, オリンパス株式会社, 東京, 日本) および実体顕微鏡 (SZX12, オリンパス株式会社) により観察した。

d) 血液性状検査

2003 年度の選別調査にて得られたマダイ稚魚を、ポリカーボネイト製 500L 円型水槽 (以下、パンライト) に正常個体と椎体欠損による短軀症個体にわけて約 50 尾ずつ収容し 30 日間飼育した。その後、氷水致死させた正常個体 14 尾 (34.1 ± 4.6 g) および短軀症個体 14 尾 (40.5 ± 5.2 g) の血液を採取した。測定項目は、ヘマトクリット値 (以下, Ht 値), ヘモグロビン量 (以下, Hb 量), カルシウム濃度 (以下, Ca 濃度), 無機リン濃度 (以下, P 濃度), およびアルカリ性フォスタファアーゼ (以下, ALP) の 5 項目とし、それぞれ、毛細管法, シアンメトヘモグロビン法 (ヘモグロビン-テストワコー, 和光純薬株式会社), OCPC 法 (カルシウム C テストワコー, 和光純薬株式会社), モリブデンブルー法 (ピーテストワコー, 和光純薬株式会社) および *p*-ニトロフェニルリン酸基質法 (アルカリ性ホスファ B-テストワコー, 和光純薬株式会社) によって測定した。

e) 統計処理

本実験で得られたデータは、一元分散分析, または, F 検定の後, Student's *t*-test および Welch's *t*-test により 5% の危険率で有意差検定を行った。有意差検定には統計解析ソフト (StatView version 4.5 Abacus Concept) を用いた。

II- 2. 結 果

a) 外部形態の比較

TCPL/BH の値は、正常個体および短軀症個体の平均値がそれぞれ 1.71 および 1.59 であり、短軀症個体は有意に小さい値であった ($p < 0.05$)。また、最頻値はそれぞれ 1.75-1.80 および 1.60-

1.65 であった (Fig. II-4-A)。この結果より同体高の個体であれば短軀症個体は正常個体に比べ軀幹部が短いことが明らかとなった。

TCPL/HL の値は、正常個体および短軀症個体の平均値がそれぞれ 2.34 および 2.25 であり両者に有意な差はみられなかった。また、最頻値はそれぞれ 2.40-2.45 および 2.25-2.30 であった (Fig. II-4-B)。

BH/HL の値は、正常個体および短軀症個体の平均値がそれぞれ 1.37 および 1.41 であり、短軀症個体は正常個体に比べ有意に大きな値であった ($p < 0.05$)。また、最頻値はそれぞれ 1.33-1.35 および 1.40-1.43 であった (Fig. II-4-C)。この結果より、短軀症個体は正常個体に比べ、同じ頭長であれば体高が高いことが明らかとなった。これらの外部形態の結果をまとめると、短軀症は正常個体に比べ軀幹部が短いだけでなく、体高が高いことが明らかとなった。

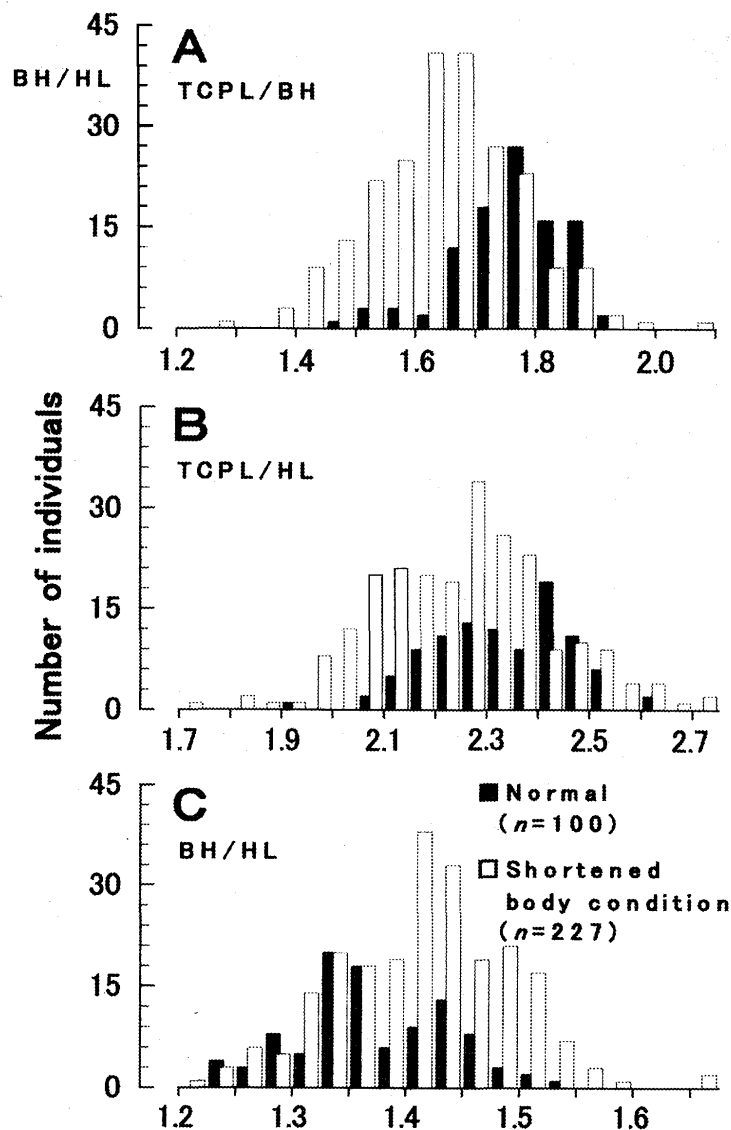


Fig. II-4. Frequency distribution of body proportion in red sea bream, *Pagrus major*, seedlings. A; ratio of the standard length excluding the head length in relation to the body height (TCPL/BH). B; ratio of the standard length excluding the head length to the head length (TCPL/HL). C; ratio of body height in relation to the head length (BH/HL).

b) 軟X線画像による診断

b-1. 脊椎骨異常の分類

短軀症個体で見られた脊椎骨異常では、椎体欠損のみの個体の発生率は、62.2%と最も高率であった。次いで、短縮椎体のみの個体の発生率で29.8%であった。前弯症のみの個体および複数の症状の合併症個体および特に異常がない個体の発生率はそれぞれ2.5%、3.4%、3.4%であり、どれも低率であった (Fig. II-5)。複数の症状の合併症では、すべての個体で椎体欠損が観察された。また、椎体が欠損した異常な椎体周辺で短縮椎体が多く観察された。以上の結果から、椎体の欠損および短縮椎体症が観察された個体を合わせると95.4%であり、ほぼ全体を占めることから、この2つの症状が短軀症の主な症状であることが明らかになった。

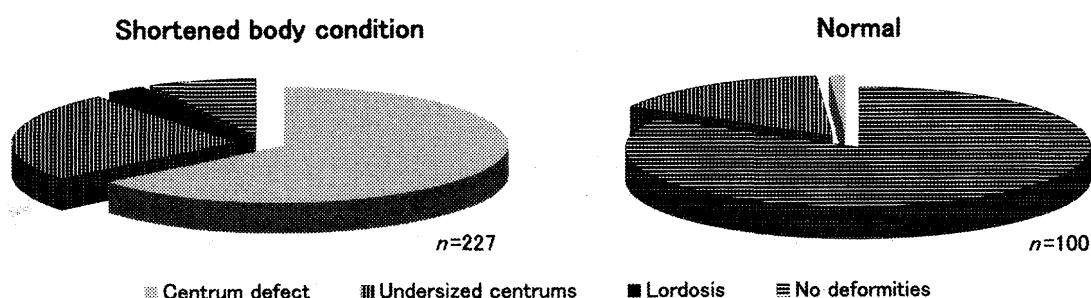


Fig. II-5. Incidence of vertebral anomalies in red sea bream, *Pagrus major*, seedlings sorted as normal and shortened body condition individuals in the practical production.

b-2. 椎体欠損の発生部位および頻度

椎体欠損の発生部位は腹椎後半に集中し、第7椎体が15%、第8椎体が16%、第9椎体が12%、第10椎体が11%であり、この4つの椎体で全体の54.1%を占めていた (Fig. II-6)。これに対し、第11椎体から第23椎体の尾椎での発生率は21%であり、腹椎に比べ少なかった。また、1個体で連続した欠損は最高で6椎体であった。また、1個体中最高8椎体の欠損のある個体が存在した。

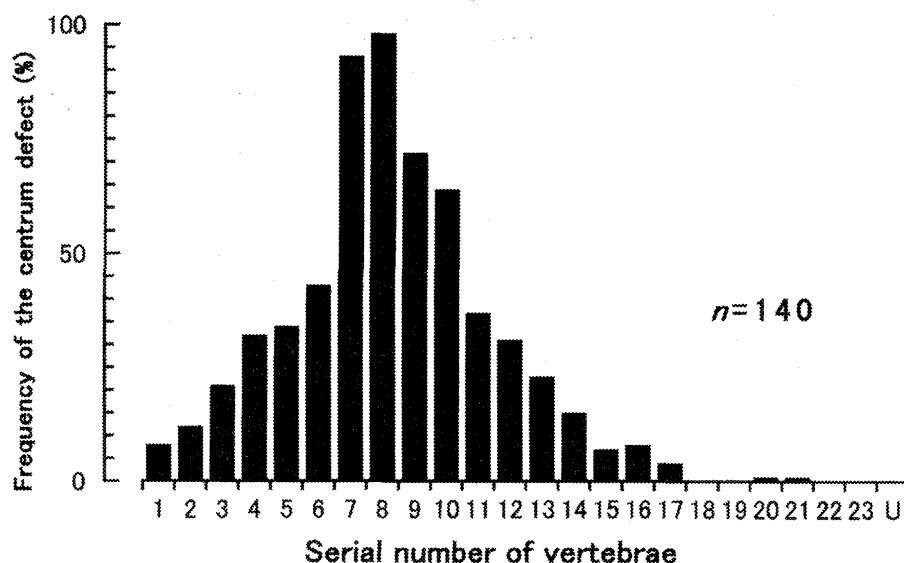


Fig. II-6. Occurrence of centrum defects in red sea bream, *Pagrus major*, seedlings. U; urostyle.

b-3. 短縮椎体の判別

正常椎体および短縮椎体の TCL/BH は平均でそれぞれ 1.65 および 1.56 であり、正常椎体は短縮椎体に比べ有意に大きな値であった ($p < 0.05$)。また、最頻値は、それぞれ区間 1.60-1.65 および 1.55-1.60 にあった (Fig. II-7-A)。また、正常椎体および短縮椎体の TCD/BH は平均でそれぞれ 1.06 および 1.00 であり、正常椎体は短縮椎体に比べ有意に大きな値であった ($p < 0.05$)。また、最頻値は、それぞれ区間 1.04-1.08 および 1.00-1.04 にあった (Fig. II-7-B)。

これらの結果から、脊椎骨の TCL/BH の値が 1.60 未満であれば短縮椎体であり、1.60 以上であれば正常椎体と判別した。また、この判別基準によって選別調査において正常個体として選別された個体を再度判別してみると、選別調査では正常と判断されたうちの 15.8% の個体が短縮症として判別された。一方、7.9% の個体が、選別調査にて短縮症として選別されたにもかかわらず正常個体であると判別された。

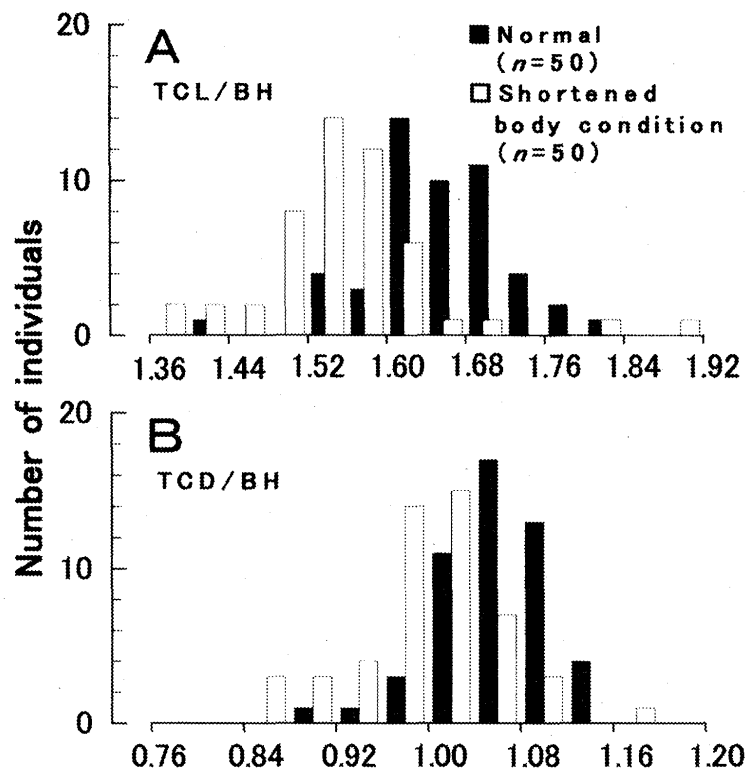


Fig. II-7. The frequency distributions of the relative total centrum length and diameter to body height in red sea bream, *Pagrus major*, seedlings. A; ratio of the total centrum length (the some total of each centrum length except for the first centrum and urostyle; TCL) in relation to body height. B; ratio of the total centrum diameter (the some total except for the first centrum and urostyle; TCD) in relation to body height. The examined specimens were sorted as shortened body condition individuals in the seedling production. Specimens having lordosis and centrum defects were excluded in this examination.

b-4. 短縮椎体の発生部位および短縮率

短縮椎体個体における椎体の短縮は、椎体長および椎体径ともに、第2椎体から第23椎体の全椎体で観察された (Fig. II-8)。また、椎体の短縮率は全椎体ではほぼ同じであり、椎体長では正常椎体より約10%短縮し、椎体径では正常椎体より約15%短縮していることが明らかとなった。

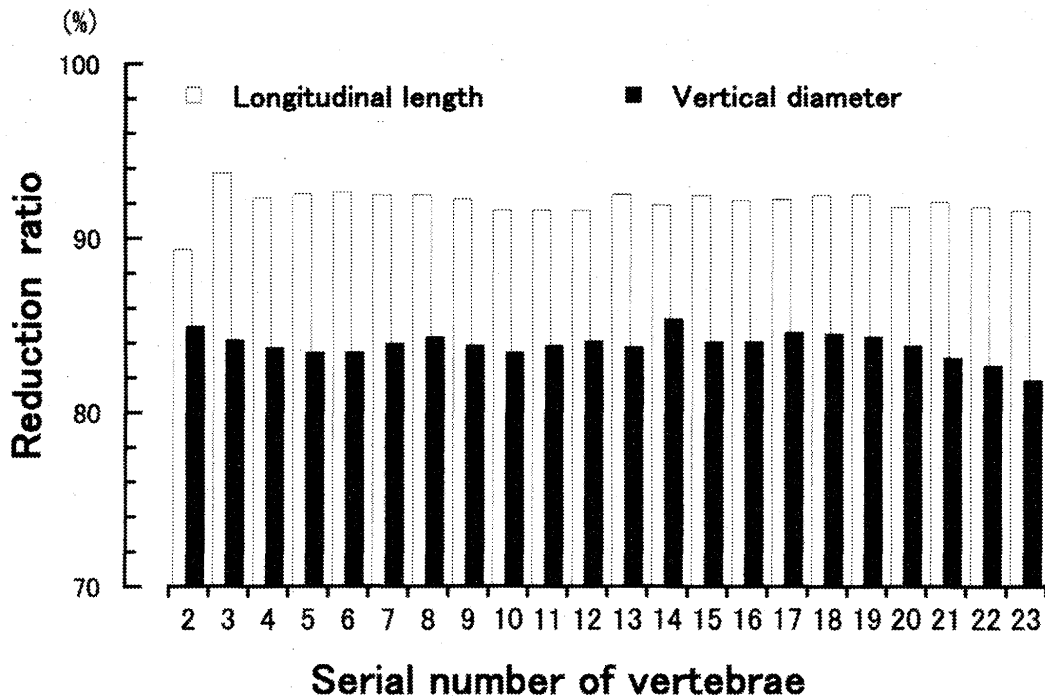


Fig. II-8. Reduction of centrum length and diameter in undersized centroms (2nd-23rd). Average lengths and diameters in normal specimens ($n=42$) indicate 100% compared to shortened body condition specimens ($n=38$).

b-5. その他の骨異常

前背鰭骨の異常 選別調査にて得られた正常個体および短軀症個体の両者において、第1前背鰭骨の弯曲および第3前背鰭骨の弯曲、収縮、欠損が観察された (Fig. II-9-A, B および C)。第1前背鰭骨の弯曲は、正常個体で28.3%、短軀症個体では30.3%の個体に観察された。また、第3前背鰭骨の弯曲、収縮および欠損は、正常個体では、それぞれ6.7%、15.0%および17%、短軀症個体では、それぞれ2.9%、21.4%および7.8%の個体に観察された。

神経棘および血管棘の異常 神経棘および血管棘の屈曲および骨腫は短軀症個体のみで観察された (Fig. II-9-D, E および F) ($p<0.05$)。また、その発生率は、神経棘でそれぞれ0.8%および4.6%、血管棘では0.4%および2.9%であった。神経棘および血管棘の屈曲および骨腫双方の症状は、神経棘および血管棘に同時に見られる傾向があり、同時に見られた個体は、屈曲のある個体では6尾中3尾、骨腫のある個体では、11尾中7尾に同時に見られた。また、これらの症状は、椎体が欠損した異常な椎体および短縮椎体または、その周辺部位に観察された。

第1椎体の異常 選別調査によって得られた正常個体および短軀症個体の双方において、第1椎体の異常がみられた。異常な椎体は、体軸に対して垂直方向に椎体の短縮が観察され、後頭骨および第2椎体との間に埋没し台形状であった (Fig. II-9-G および H)。第1椎体異常の発生率はそれぞれ、選別調査によって正常とされた個体が35.0%、短軀症個体が56.2%であり、正常個体にも多く観察された。

椎体間隙の不整 選別調査によって得られた正常個体および短軀症個体の双方において椎体間隙の不整が観察された (Fig. II-9-J および K)。正確な発症率は得られていないが、短軀症個体は正常個体に比較して多い傾向にあった。

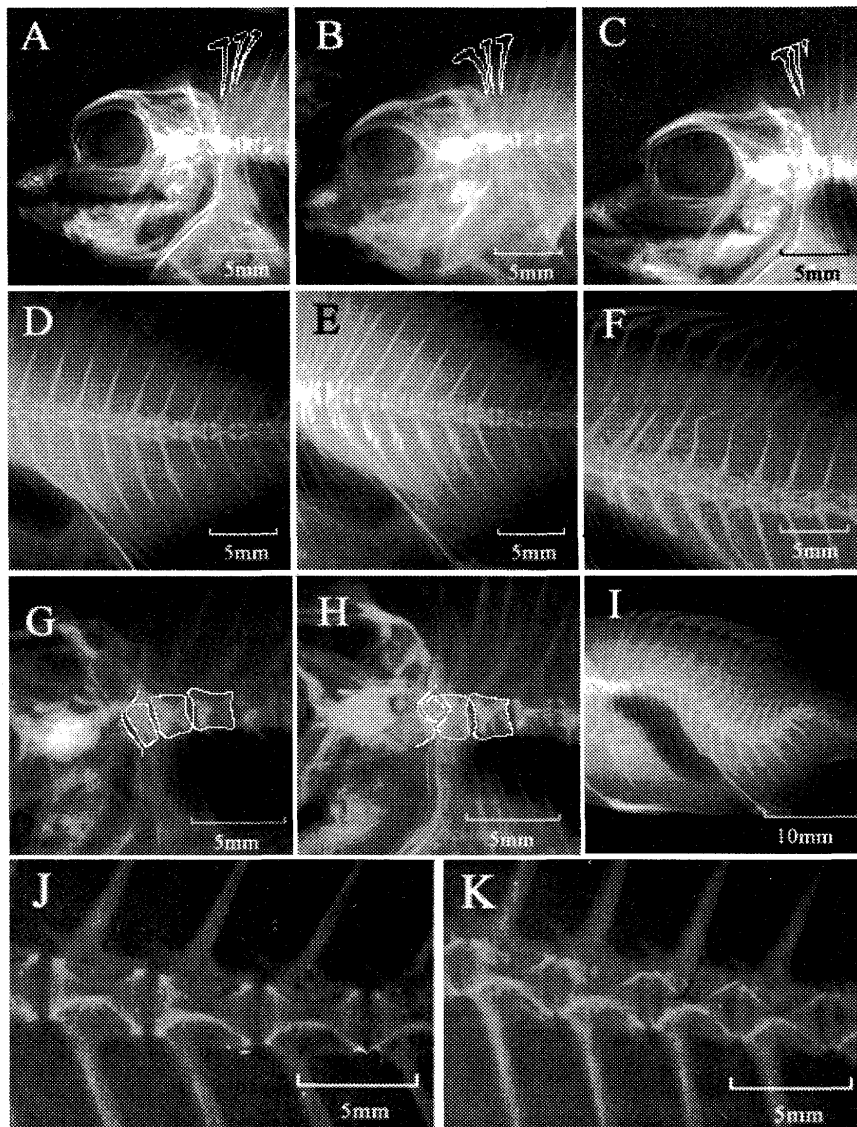


Fig. II-9. X-ray photographs of red sea bream, *Pagrus major*, seedlings. A, D, G and J; Normal. B; Curvature of the first predorsal. D; Shortage of the third predorsal. F; Osteosarcoma of neural spine and hemal spine. H; Shortage of the first vertebral column. I; Lordosis. K; Shortage of interbody. The outline of the bone was described with a white line to emphasize the symptom. White arrow heads show location of normals and anomalies.

c) 異常脊椎骨の外部および内部形態

c-1. 脊椎骨外部形態の観察

マダイの正常個体では、神経棘および血管棘はそれぞれ 23 および 12 存在する (Fig. II-10-A, D, および G)。椎体欠損が見られた個体においてもその数は変わらず一定数存在した。しかし、椎体欠損症における異常椎体には 1 つの椎体に複数の神経棘および血管棘が付随していた。また、異常椎体に不随する神経棘および血管棘の数に応じて、体軸と垂直方向に骨梁が存在する複雑で独特な形状をしていた (Fig. II-10-B, E, および H)。一方、短縮椎体が見られた個体では、椎体の基本構造は正常椎体と異ならなかった (Fig. II-10-C, F, および I)。しかし、骨密度が正常個体に比べて高い個体がしばしば観察された。

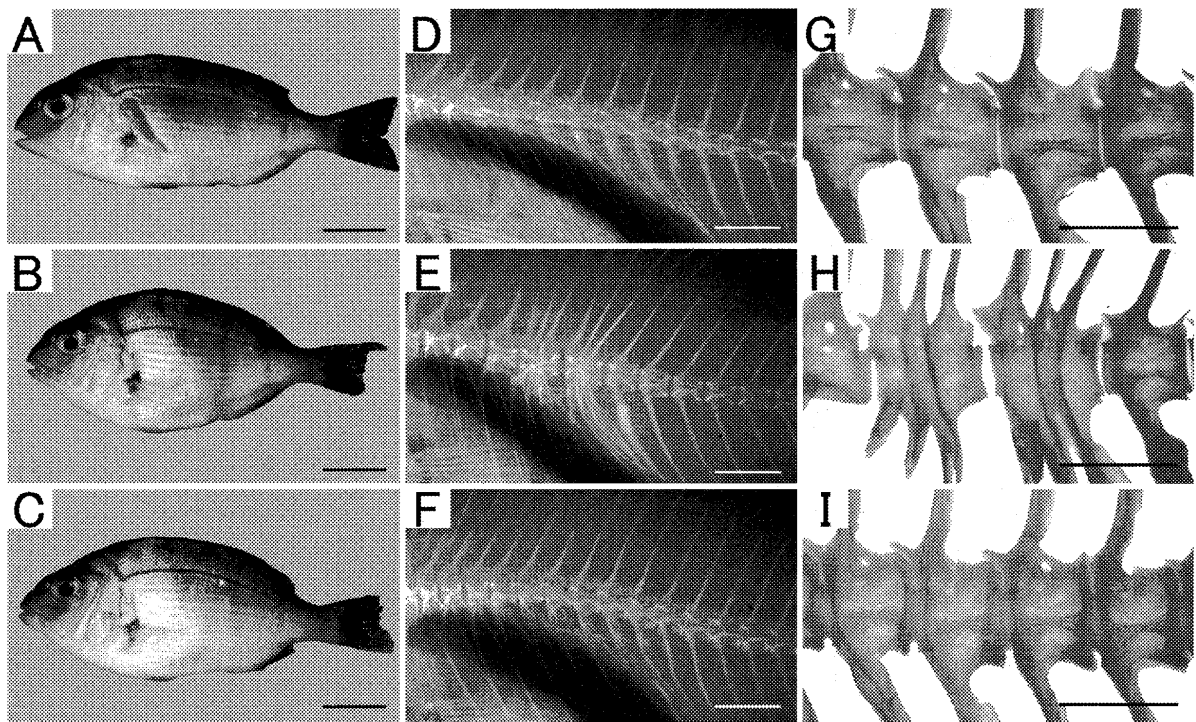


Fig. II-10. Examples of fish external appearance and their vertebrae of normal and shortened body condition red sea bream, *Pagrus major*, seedlings. A, D, and G, normal specimen; B, E, and H, shortened body condition specimen with centrum defects; C, F, and I, shortened body condition specimen with undersized centra. Specimens were X-rayed on apparatus (D, E, and F), and cleared and double-stained the cartilages and bones with alcian blue and alizarin red S (G, H, and I). Bars in A to C, D to F, and G to I indicate 1 cm, 5 mm, and 3 mm, respectively.

c-2. 脊椎骨内部形態の観察

正常な椎体の骨形状は、椎体を正中線で切断した切片で見ると鼓型をしており、1つの椎体に対し、1組の神経棘と血管棘が対在する (Fig. II-11-A および C)。椎体欠損症で見られる異常な椎体においても、やや複雑な構造であるが同じ鼓型をなし、基本構造において正常椎体と異常椎体との違いは見られなかった (Fig. II-11-B および D)。また、透明骨格標本を作成して観察した椎体欠損症の異常椎体に見られた骨梁部位 (Fig. II-10-H) は、外部形状からは、椎体と椎体の境目を形成しているように見えるが、その内部骨形状には不連続性が見られなかった。また、正常な椎体では、椎体と椎体との間には、両者を結びつける靱帯が存在する (Fig. II-11-C)。しかし、椎体欠損症で見られる異常椎体には、複数の神経棘および血管棘が付随している骨梁部位においても、椎体と椎体との間の靱帯が存在しなかった。したがって、椎体欠損症で見られる異常椎体は、複数の椎体が癒合したものではなく、1つの椎体であることが明らかとなった。一方、咽頭骨においては、正常個体および異常個体の骨組織において顕著な違いは見られなかった。

d) 血液性状検査

正常個体および短軀症個体のヘマトクリット値 (以下, Ht 値), ヘモクロビン量 (以下, Hb 量), 血漿カルシウム濃度 (以下, Ca 濃度), 血漿無機リン濃度 (以下, P 濃度), およびアルカリ性ファースタファーゼ濃度 (以下, ALP 濃度) を Table II-1 に示した。いずれの項目も正常個体と短軀症個体で有意な差は見られなかった。

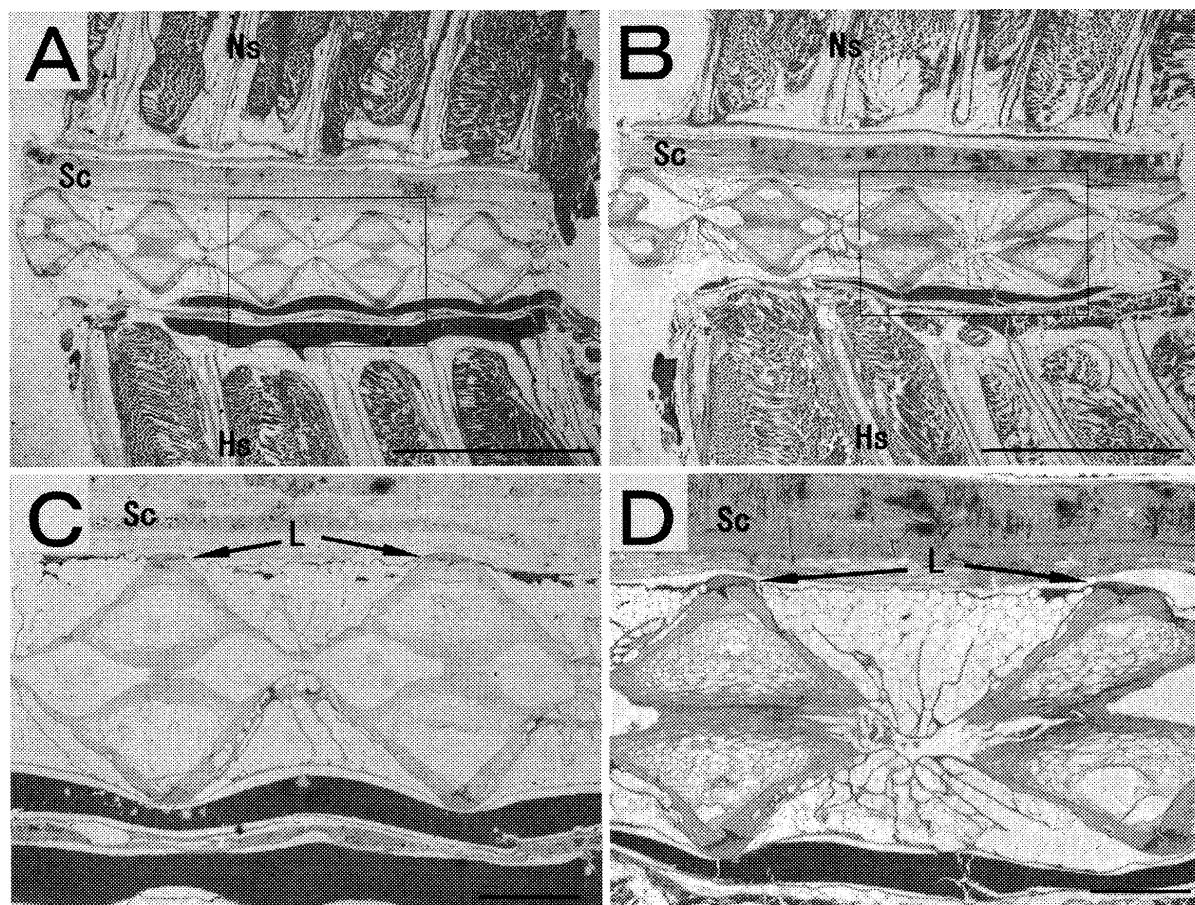


Fig. II-11. Sagittal sections show normal and abnormal vertebrae. A; normal vertebrae, B; abnormal vertebrae having centrum defect. C and D; higher magnification of the encased area in A and B, respectively. Sc; spinal cord, Ns; neural spine, Hs; hemal spine, L; ligament. Bars in A and B indicate 5 mm, and C and D indicate 1 mm, respectively.

Table II-1. Plasma constituents of red sea bream *Pagrus major* normal and shortened body condition with centrum defects

	Body weight (g)	Hemaoclit (%)	Hemoglobin (g/100 ml)	Calcium concentration (mg/100 ml)	Phosphorus concentration (mg/100 ml)	Activity of ALP (IU/l)
Normal	$40.5 \pm 5.2^{*1}$	32.0 ± 2.5	8.9 ± 1.1	14.4 ± 1.6	11.6 ± 0.9	33.7 ± 5.1
<i>n</i>	14	14	13	13	13	13
Shortened body condition	34.1 ± 4.6	31.7 ± 4.2	7.8 ± 1.4	13.1 ± 1.1	11.9 ± 0.7	29.5 ± 5.4
<i>n</i>	14	14	14	12	12	12

*¹ mean \pm standard deviation

II-3. 考 察

a) 短軀症の形態的特徴と選別基準

外部形態の測定の結果、短軀症は正常個体に比べ TCPL/BH は有意に低く、BH/HL においては有意に高いことが明らかとなった。つまり、正常個体に比べ軀間部が短いだけでなく、体高も高い形態的特徴を有することが明らかとなった。ゆえに、今後の誘導実験等において、発生した短軀症が、生産現場で発生する短軀症と同じであるか否かを特定する要因の1つになると言える。

生物の形態を比較する上で、Bookstein (1997) は Centroid Size (以下, CS) を形状の特徴を1つの数字で表すことのできる指数として提唱している⁵⁴⁾。つまり, CS は体長や体高といった従来の測定値だけでなく, 魚全体や骨全体にそった長さや深さの2次元構造の情報を表すことができる指標であり, 外部形状⁵⁵⁾ や骨形状⁵⁶⁾ の比較およびヒラメの初期発育段階の決定⁵⁷⁾ などに用いられている。本研究においても, 従来の測定値だけでなく, CS を用いることにより, より短軀症の形態をより正確に反映することができると考えられる。

Table II-2. Morphometry of external appearance of red sea bream seedlings produced in the spring of 1999

	SL (mm) ^{*2}	HL (mm) ^{*3}	BH (mm) ^{*4}	TCPL (mm) ^{*5}	TCPL/HL ^{*6}	TCPL/BH ^{*7}	n
Normal	8.18	2.45	3.35	5.73	2.34	1.71	100
Shortened body condition	7.80	2.39	3.37	5.42	2.25	1.60	227
Centrum defects							
1 ^{*1}	7.84	2.41	3.33	5.43	2.26	1.63	38
2	7.83	2.41	3.43	5.42	2.25	1.58	50
3	7.71	2.42	3.45	5.29	2.20	1.53	28
4	7.76	2.46	3.59	5.30	2.16	1.48	12
5	7.62	2.46	3.62	5.16	2.11	1.43	10
6	7.10	2.50	3.40	4.60	1.84	1.35	1
8	6.80	2.20	3.50	4.60	2.09	1.31	1
Mean	7.77	2.42	3.44	5.36	2.22	1.56	140
Undersized centurms	7.92	2.40	3.38	5.52	2.32	1.64	46

*1 total number of centrum defects.

*2 SL, Standard Length.

*3 HL, Head Length.

*4 BH, Body Height.

*5 TCPL, the length of standard length excepting head length.

*6 TCPL/HL, SHL in relation to HL.

*7 TCPL/BH, SHL in relation to BH.

本実験結果を選別基準として生産現場で応用する場合, 問題が生じる。つまり, 最頻値の前後 (TCPL/BH では 1.65, BH/HL) において短軀症と正常個体を選別する場合, 多くの個体において, 短軀症であるのに正常個体, または正常個体であるのに短軀症として選別されることになりなる (Fig. II-4)。これは, 短軀症の多くは軽微な異常であり, 正常個体と1つや2つの椎体欠損および短縮椎体による短軀症との TCPL/BH では有意な差はみられず, 体高および体長といった測定値のみで正常個体と短軀症を選別することは困難であるからである (Table. II-1)。また, 系統間によって外部形態が変化することが報告されている^{58, 59)}。種苗生産に用いられる採卵親魚は, これまで近畿大学水産研究所にて選抜育種された個体のみではなく, それ以外を用いる場合があり, 生産年度や生産ロットおよび各種苗生産現場間でマダイ種苗の形態が異なっている。この背景には, 各養殖業者において正常魚の基準が異なることも考えられる。選別基準においても短軀症の同定と同様に, CS による選別基準の設定は有効ではないかと考えられ, 各養殖業者に見合った CS の基準を設定することが必要となると思われる。

b) 椎体欠損と短縮椎体

軟X線調査によって, 短軀症の主な症状は椎体欠損および短縮椎体であることが明らかとなっ

た。脊椎骨異常の約 2/3 を占めた椎体欠損は、マダイやヒラメおよびニジマスなど多くの魚種にて脊椎骨癒合として報告されている^{2,11,25-41)}。しかしながら、本実験の結果から、この症状は脊椎骨癒合ではなく椎体欠損であると考えている。その理由は以下の 2 点により判断される。1 つ目の理由として、異常な脊椎骨は 1 つの椎体に 2 対以上の神経棘および血管棘が付随しているものの、椎体の内部骨形状は正常個体と基本的構造において差が見られなかったことである (Fig. I-2-11-B および D 参照)。仮に隣り合う 2 つの脊椎骨が癒合したならば、内部の鼓型をした骨形状も 2 つ存在すると考えられる。しかし、久保・浅野 (1987)⁶⁰⁾ のニジマスにおける報告例と同様に、異常椎体内部にはそのような構造はみられず、基本構造を維持していた。2 つ目の理由は、通常、正常な脊椎骨とその隣り合う脊椎骨の間には、環状の靱帯が存在する⁶¹⁾。しかし、異常な脊椎骨には靱帯や不連続な骨組織が存在しなかった事である (Fig. II-11-D)。本実験では椎体欠損と判断したが、椎体欠損として確証を得るためには、透明骨格標本や組織切片だけでは不十分であり、今後、分子生物学的手法などを用いたさらに詳しい分析が必要である。

一方、短縮椎体は椎体欠損に次いで多く発生し、短軀症における脊椎骨異常の約 1/3 を占めることが明らかとなった。この症状は本実験にて短縮椎体と判別した個体の椎体長および椎体径は、正常個体に比べそれぞれ 92% および 84% に短縮していた。これまでに成長に伴う椎体長の伸張と椎体径¹¹⁾の短縮や椎体長の短縮⁶²⁾といった報告例はあるものの、このような症状の椎体は報告された例はない。その理由として、マダイ種苗生産が始まった当初は形態異常と認識されず、今日の選別基準の強化によって形態異常として認識されるようになったと考えられる。短縮椎体による短軀症は、異常の程度がわずかであるが商品価値がないのは事実である。しかし、この症状の原因は明らかではないものの、極端な一部の短縮椎体を除き、短縮率が約 10~15% と軽微であるため、多くの短縮椎体は異常ではなく個体差なのかもしれない。種苗生産に用いる親魚の系統によって、生産された稚魚の外部形態に差があることは、谷口ら (1995)⁵⁹⁾ の報告でも明らかとなっているが、実際の生産現場においても成長速度や色や形といった形質を判断して選抜育種が行われている⁶⁾。しかし、防止方法がない現段階では、種苗生産に用いる親魚を厳選する以外にないと思われる。

脊椎骨以外における骨異常については、椎体欠損および短椎骨症と共に、神経棘および血管棘の屈曲および骨腫が観察され、これら 2 つの症状は、正常個体には全くみられなかった。しかし、この症状は、Schlumberger and Lucke (1948)⁶³⁾ によって 15 の魚種で報告されているように、マダイの椎体欠損および短縮椎体における特有の症状ではないと考えられる。また、高橋 (1924)⁶⁴⁾ はマダイの骨腫を 102 例報告し、幼条虫などの寄生虫との関連性を指摘している。しかし、明確な原因は不明であり、椎体欠損と短椎骨症との病理学的関連も明らかではない。また、椎体間隙の不整は数多くの魚種で述べられている¹¹⁾。本研究においても短軀症には椎体間隙の不整は多い傾向がみられる。しかし、前背鰭骨および第 1 椎体の異常と同様に、正常個体においてもかなりの割合で観察されたため、脊椎骨の異常との関連性は低いように思われる。したがって、現在のところ椎体欠損および短縮椎体による短軀症は、脊椎骨の異常のみが発生し、内臓骨格や付属骨格などその他の骨格異常が特異的に発生することはないと考えられる。

c) 短軀症の原因の推定

形態異常を生じさせる要因には次のようなことが考えられる。まず 1 つ目に生物的要因として、親魚由来の遺伝的要因、飼育水由来の感染症や寄生虫症および過剰症や欠乏症など栄養疾患。2

つ目に物理的要因として、水槽への衝突や分容などのハンドリング、培養水や飼育水の酸素濃度および水温。3つ目に化学的要因として重金属汚染や抗生物質投与などが上げられる。

c-1. 親魚由来の遺伝的要因の可能性

マダイの短軀症に関してアイソザイム遺伝子を遺伝標識とした対立遺伝子の頻度の変動や遺伝的変異について研究がなされているが、短軀症個体と正常個体との間に差はみられていない⁶⁵⁾。形態的特徴のような量的形質はポリジーン性⁶⁶⁾といわれ、複数の遺伝子座からの働きを受け、影響を及ぼし合い、環境の影響を強く受ける形質とされている。谷口ら¹²⁾は形態異常をもたらす原因に遺伝的要因があるとすれば、それは異常の発現を直接的に支配するものでなく、発現に関する後天的要因に対しての感受性に関係する遺伝子であることを示唆している。例えばメダカの場合、椎体欠損と短縮椎体の両現象を支配する *fu*-因子の発現度は、発生時の水温に著しく影響を受けることが知られている⁶⁷⁾。仮に先天的な遺伝的要因が関与しているとしても、親魚群を交換しても毎年のように短軀症が発生することから (Table II-1), その影響は少なく、水温など他の要因で発生するものと考えられる。

c-2. 感染症および寄生虫症の疾病の可能性

感染症や寄生による脊椎骨の形態異常も種々報告されている。細菌症では、ブリにおける *Streptococcus* sp. の感染²³⁾ およびニジマスにおける *Flavobacterium* sp. の感染^{36, 37)}、原生動物ではスズキおよびイシダイにおける粘液胞子虫の脳寄生が知られている²²⁾。しかし、多くの場合、これら感染症や寄生虫症の原因による脊椎骨の形態異常は、脊椎骨の屈曲である。マダイがこれら細菌や寄生虫などの影響により短軀症が発生している可能性は否定できないが、脊椎骨の化骨化が完了していない孵化後 20 日までの間に、特定種の細菌感染または寄生といった限られた条件で発生するものと考えられる。

c-3. 過剰症や欠乏症など栄養疾患の可能性

栄養疾患による脊椎骨形態異常は、ビタミン A および関連物質過剰投与^{32, 33, 44)} やビタミン C 欠^{18, 24)} やカルシウム欠乏²⁰⁾ などが報告されている。ビタミン A は、現在でも養殖種苗生産ではアルテミアへの栄養強化剤として微量に含まれるが、異常が検出された濃度とはかなりの隔たりがあるため、本研究との関連性はきわめて低いと考えられる。またビタミン C の投与量は、魚体重 1 kg あたり 1 日 3~5 mg が必要とされている⁶⁸⁾。しかし、種苗生産において、貯蔵時の損傷を考慮し余分に配合しているため、短軀症の原因はビタミン C 欠乏により引き起こる可能性も低いと考えられる。Takagi and Yamada (1993)⁶⁹⁾ は、淡水条件下におけるティラピアでは、飼料および環境水中のカルシウム不足により骨吸収の促進が観察されたことを報告している。しかし、マダイなど海産魚類においては飼料中のカルシウム量の多少による骨形成の異常はないとする報告例⁷⁰⁾ もあることを考慮すると、短軀症が、カルシウムの欠乏により引き起こされる可能性も低いと考えられる。ビタミンやカルシウムなどの栄養疾患は咽頭骨や脊椎に異常が出ることが知られている。本実験では、椎体欠損および短縮椎体による短軀症において、咽頭骨や脊椎に異常はみられず、また、Ht 値、Hb 量、Ca 濃度、P 濃度、ALP といった血液性状についても、既知の測定値⁷¹⁾ と差はみられないことから、栄養疾患の可能性は低いと考えられた。

c-4. 培養水や飼育水の酸素濃度および水温の可能性

異なる水温帯で孵化させた稚魚において、高水温および低水温で脊椎骨の癒合⁴⁰⁾ や脊椎骨数の変異^{72, 73)} が報告されている。生産現場では、冬期、水温を飼育適水温に保つため、水槽側面に

熱交換用のチタン管を設置している。加熱中のチタン管付近の水温は約 40 度前後となり、水温ショックによる影響が懸念される。一方、胚発生期において、溶存酸素濃度の低下に伴う短軀状の奇形発生が報告されている^{74,75)}。生産現場において、100 万粒以上の受精卵の分離作業や卵輸送など胚発生期に溶存酸素濃度が低下する状況が考えられる。したがって、水温や溶存酸素濃度などの要因は形態異常、特に脊椎骨異常に関与している可能性は高いと考えられる。

今後、短軀症の原因解明を進めて行くためには、水温や溶存酸素濃度など、短軀症の原因として考えられる要因について、飼育実験を行い検証する必要があると考えられる。次いで、短軀症の発生過程における症状の進行の様子をつかむことが重要であると考えられる。特に椎体と神経棘および血管棘や椎弓の発生過程を解明することは、椎体欠損の原因解明につながると考えられる。現在、椎体と神経棘および血管棘や椎弓の発生過程は異なり、前者は未熟間葉細胞が硬節に分化後膜性骨化する。しかし、後者は、硬節には分化せず軟骨内骨化する⁷⁶⁾という見解が一般的であるが、まだ正確にはわかっていない。また、発生時期を特定するために、発生初期からの連続モニタリングが必要であると考えられる。

第Ⅲ章 椎体欠損による短軀症の原因解析

第Ⅰ章では、選別調査によりマダイの種苗生産過程における形態異常において、短軀症が最も高率に発生し、短軀症の防止が優先的課題であることを述べた。そして、第Ⅱ章では、その短軀症を骨形態学および骨組織学的に調査し、短軀症状の特徴を明らかにするとともに、椎体欠損が主な症状であることを述べた。そこで本章では、短軀症の原因解析の次のステップとして、椎体欠損に的を絞り、前章にて予測された環境要因について検討した。

養殖生産の現場においては、胚発生期や仔魚期において急激な水温上昇や長期の低酸素状態など不適切な環境条件に置かれた場合、形態異常が高率で発生することが知られている。これらの報告やこれまでの調査結果を考慮すると、環境要因は椎体欠損の原因となりうるということが十分考えられる。環境要因として第1節で低酸素の影響について検討し、第2節で高水温の影響について検討した。

第1節 胚発生期の低酸素処理による椎体欠損の誘導

Ⅲ-1-1. 材料および方法

a) 供試卵

大島事業場にて養成された平成11年産マダイ親魚群より、平成15年3月13日に自然産卵した受精卵（孵化率94.0%）を用いた。受精卵は実験に用いるまでの間、水温19℃、溶存酸素濃100%で培養した。この実験で用いた卵は、発生段階を一致させるため、数分の間に産卵された受精卵のみを回収して用いた。

b) 低酸素処理

受精卵は5つの異なる発育段階；産卵後1.0～7.0時間の2細胞期から胞胚期（2B stage）、産卵後9.5～15.5時間の囊胚期（G stage）、産卵後17.5～23.5時間の3～10体節形成期（ES stage）、産卵後24.5～30.5時間の11～17体節形成期（MS stage）、産卵後32.5～38.5時間の18～24体節形成期（LS stage）で低酸素処理を行った（Fig. Ⅲ-1-1）。具体的な低酸素処理方法は以下の通りである。溶存酸素濃度約115%、水温19℃にて培養した受精卵は、各発育段階に達した時点で、約5000粒を、20L容器中で窒素ガスにて溶存酸素濃度を10.3～16.6%に低下させた海水と共に収容し、6時間低酸素処理を行った（Fig. Ⅲ-1-2）。処理中の水温は培養水温である約19℃に維持した。低酸素処理後は、再び溶存酸素濃度約115%、水温19℃にて培養した。また、低酸素処理を行わない受精卵を対照区として用いた。海水の溶存酸素濃度の調節および塩分濃度の測定には、溶存酸素メーターを用いた（YSI Model 95, model 85 および model 550A YSI Incorporated, Yellow Springs, USA）。

c) 飼育

仔魚および稚魚の飼育は現行の大島事業場の生産方法に準じて行った。本実験の詳細な飼育方法は以下の通りである。低酸素処理を行った受精卵は、500L円型ポリカーボネイト製水槽に7500粒収容し、飼育終了まで同じ水槽で飼育した。飼育水は砂濾過および紫外線殺菌処理した

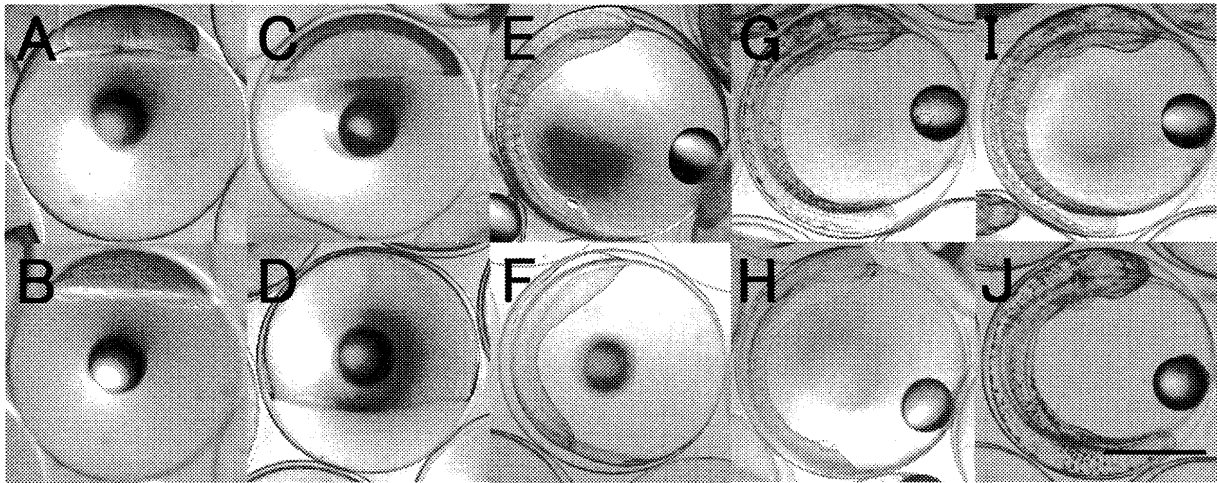


Fig. III-1-1. Embryonic development of the red sea bream. Low oxygen treatment was conducted for embryos at five different developmental stages; the two cell stage to blastula stage from 1.0 to 7.0 hours after spawning (A-B stage), gastrula stage from 9.5 to 15.5 hours (C-D stage), three to 10 somites stage of 17.5 to 23.5 hours (E-F stage), 11 to 17 somites stage of 24.5 to 30.5 hours (G-H stage), and 18 to 24 somites stage 32.5 to 38.5 hours after fertilization (I-J stage). A, C, E, G, I show the beginning stage of oxygen treatment. B, D, F, H, J show the end stage of oxygen treatment. The bar in J indicates 4 mm.

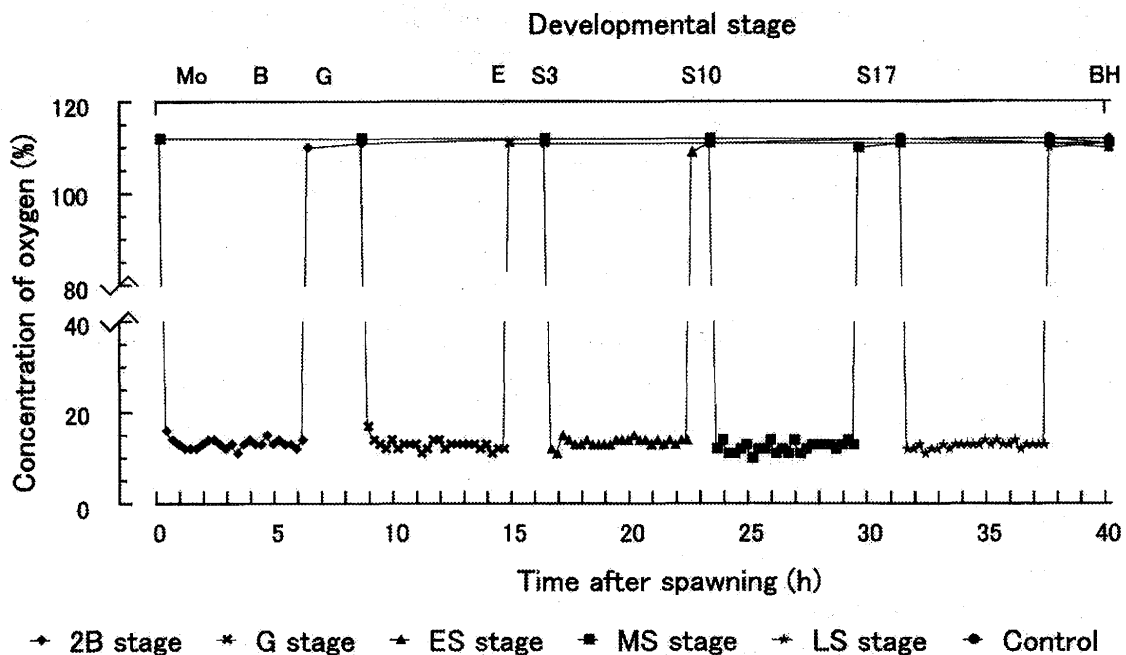


Fig. III-1-2. Low oxygen treatment during the embryonic development of red sea bream, *Pagrus major*. This treatment was conducted at five different developmental stages: 2B stage, two cell stage to blastula stage, G stage; gastrula stage, ES stage; three to 10 somites stage, MS stage; 11 to 17 somites stage, LS stage; 18 to 24 somites stage under 10.3 to 16.6% for six hours in each experimental group. Before and after low oxygen treatment, the eggs were incubated under approximately 110.0% oxygen concentration.

海水を用いた。給水は孵化後4日令換水率40%から開始し、その後、1日あたり10%の割合で給水量を増加させ、飼育終了日である40日で1日あたり400%となるよう調節した。日令27日に飼育密度を減少させるために、一定量仔魚を間引いた。仔魚および稚魚の餌料系列は、孵化後

3～21 日までは海水クロレラ *Nannochloropsis* sp. および市販の栄養強化剤 (DHA 強化剤; マリングロス, 日清サイエンス株式会社) にて強化したワムシ *Brachionus rotundiformis*, を与え, 孵化後 21～32 日の間海水クロレラおよび栄養強化したアルテミア幼生 *Artemia nauplii* を与えた。孵化後 17 日から飼育終了日までの間は, 市販の人工飼料 (アルテック K-1, K-2, および K-3, 日清丸紅飼料株式会社) を与えた。飼育期間中, 酸素濃度は 90% 以上を維持した。水温はおおよそ 21.5℃ で一定に維持した。また海水の塩分濃度は, 32.5 から 34.0ppt であり, 日照時間は自然光と蛍光灯を併用して 15 時間に調節した。

d) 体長測定

仔魚の脊索長および稚魚の体長を測定するため, 20 尾の個体は 5 日毎にサンプリングされた。サンプリングされた個体は, フェノキシエタノールで麻酔した後, 5～10% 濃度のホルマリンにて固定し, デジタルカメラ (HC-300 富士写真フイルム株式会社) で撮影後, 画像解析ソフト (Scion Image version 4.0.2, Scion Corp.) を用いて測定を行った。

e) 分析

各実験区での低酸素処理卵および対照区の未処理卵 200 粒を用いて浮上卵率を測定した。低酸素処理卵および対照区の仔魚 30 尾 (1 日令) は, 体節異常の発生率および発生部位を生物顕微鏡および実体顕微鏡を用いて測定した。

各実験区の 200 尾 (日令 40) のサンプルは, 軟 X 線撮影装置を用い 5 mA/40V で 20 秒の照射強度で行い, 軟 X 線フィルム画像により, 椎体欠損の発生率および発生部位を調査した。

脊椎骨形態をより詳細に観察するために, 各試験区の 5 尾 (日令 40) について, 軟骨・硬骨二重染色を施した透明骨格標本作製した。透明骨格標本作製方法は河村・細谷の方法⁴⁹⁾ に準じて行った。さらに, 脊椎骨組織を, 硬組織切片を作製し, 生物顕微鏡および実体顕微鏡を用いて観察した。

統計学的処理には, 仔魚の体節異常と稚魚の椎体異常の発生部位の比較には Kolmogorov-Smirnov test を用い, 分散分析として one factor ANOVA, ポストホックテストとして Tukey-Kramer で有意差検定を行った。統計処理には, 統計分析ソフト (StatView version 5.0, Abacus Concept Inc.) を用いた。

III-1-2. 結 果

a) 飼育結果

飼育水中の溶存酸素濃度は常に 90% 以上を維持し, 飼育期間中 90～119% の範囲であった (Fig. III-1-3)。また, 水温は 18.2～23.2℃ であった。

各実験区における低酸素処理後の浮上卵率は, すべての実験区および対照区で 90% 以上であった。この結果は, 酸素処理が仔魚の生残に影響をあたえなかったことを示唆している (Table III-1-1)。

飼育開始 7 日目から 13 日目において, 病名が不明の病気が発生したため, すべての水槽の水温を約 2.0℃ 上昇させ, 同時にテトラオキシサイクリンによる薬浴を行った。MS stage に処理した区の稚魚の生残率は 63.7% と低かったものの, それ以外の試験区は 40 日令で 80% の生残率であった。

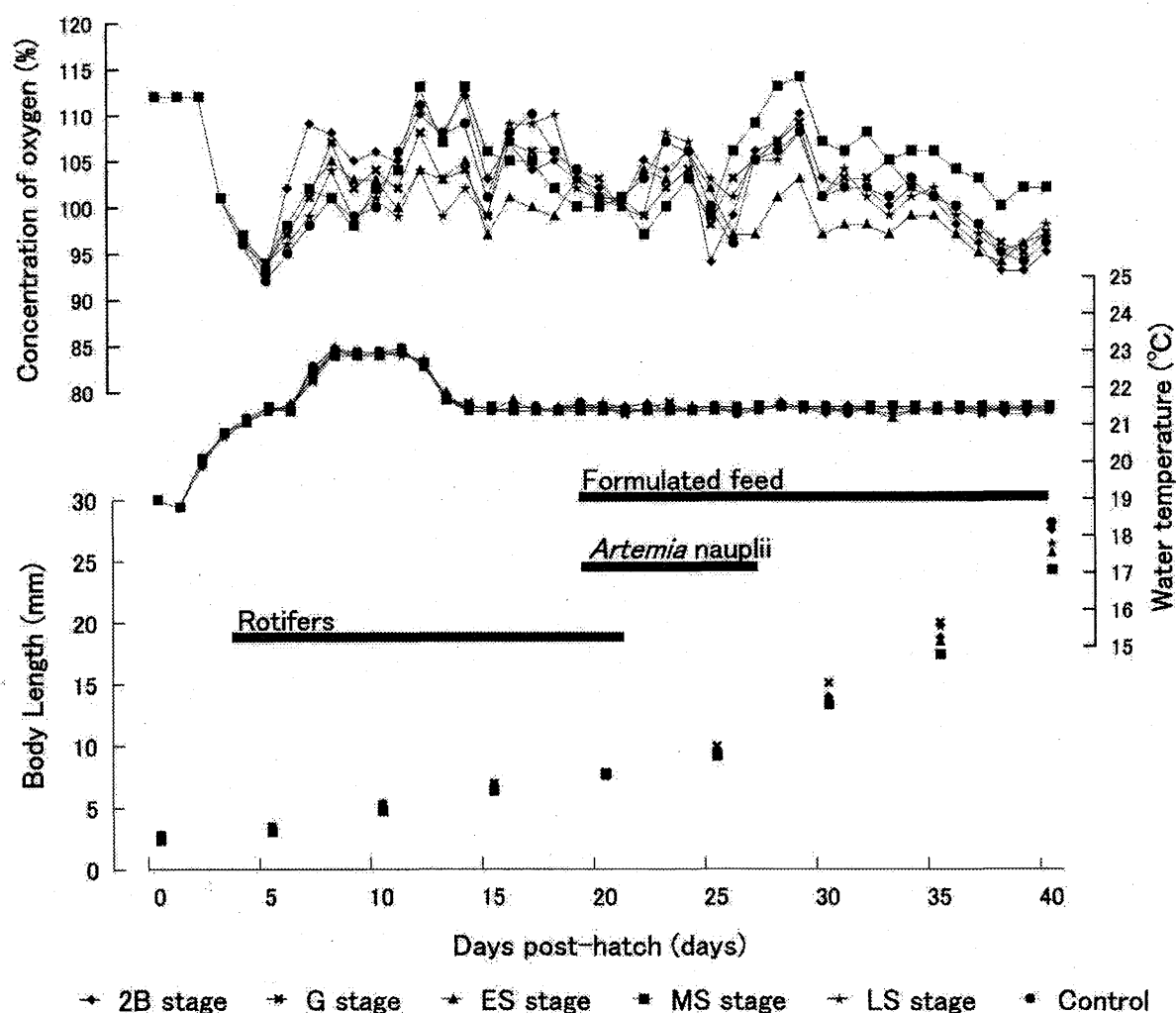


Fig. III-1-3. Rearing and growth of red sea bream larvae and juveniles which were exposed to the low dissolved oxygen concentration during the embryonic development.

孵化後 40 日令における対照区, 2Bstage および Gstage の標準体長は約 28.0 mm ($n=20$) であった。この対照区の成長は, 本実験と同時期に行われた, 産業規模の生産にて飼育された稚魚の成長 (平均 27.9, $n=20$) とほぼ同じであった。対照的に, ES, MS および LS stage 区の稚魚の標準体長はそれぞれ 25.6, 24.2, and 26.3 ($n=20$) mm であり, 他の実験区および対照区と有意な体長差がみられた ($p<0.05$)。各実験区および対照区における鰾の開腔率は 99.5% 以上であり, 実験区の間には有意な差はみられなかった ($p>0.05$, Table III-1-1)。

Table III-1-1. Effect of low oxygen treatment during embryonic development on newly-hatched larvae and juveniles of red sea bream, *Pagrus major*

Developmental stages at which embryo were treated ¹	2B stage	G stage	ES stage	MS stage	LS stage	No treatment	n^{*2}
Floating egg rate (%)	92.3	90.0	90.0	93.0	97.2	94.0	100
Hatching rate (%)	92.3	89.8	89.7	92.8	97.2	94.0	100
Rate of larvae with somitic disturbances (%)	1.7	0.0	95.5	98.3	71.7	1.7	30
Rate of juveniles with centrum defects (%)	2.0	2.0	95.0	100.0	58.0	1.0	200
Rate of swimbladder inflation (%)	99.5	100.0	100.0	99.5	100.0	100.0	200

¹2B stage, G stage, ES stage, MS stage, and LS stage indicate two cell stage to blastula stage, gastrula stage, three to ten somites stage, 11 to 17 somites stage, and 18 to 24 somites stage in the embryonic development, respectively.

²The number of specimens examined in each experimental group.

b) 仔魚の体節分節異常

孵化後1日令の仔魚の体節を顕微鏡観察した結果、ES、MSおよびLS stageにおける孵化仔魚には、体節の分節異常が見られた (Fig. III-1-4)。正常な仔魚の体節は、山形の体節が規則的に並んでいる。しかし、異常な体節では、体節の境界が不鮮明、または消失、不規則的であった。また、その発生率は、それぞれ 85.5、91.4 および 69.9%であった (Table III-1-1)。対照的に、2B および G stages および対照区においては、すべて 1.7%と低率であった。

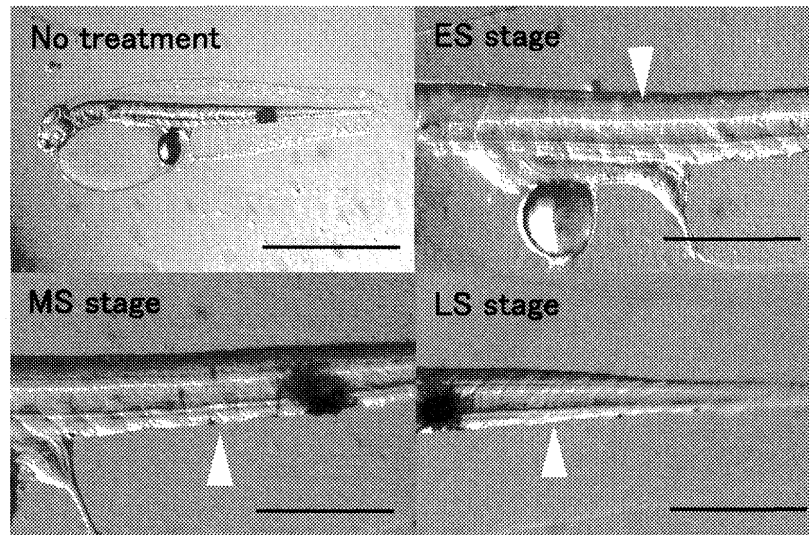


Fig. III-1-4. Examples of somatic disturbances in red sea bream newly hatched larvae. ES stage, MS stage, and LS stage were the period treated with low oxygen from three to 10 somites stage, 11 to 17 somites stage, and 18 to 24 somites stage, respectively. Arrow head shows the abnormal somite. Bars in No treatment indicate 1 mm and ES, MS and LS stage indicate 500 μ m.

c) 稚魚の外部形態

40日間の飼育した結果、稚魚の体高に対する躯間長の割合 (TCPL/BH) や頭長に対する体高の割合 (BH/HL) といった外部形態に著しい差異がみられた。2B および G stage と未処理の対照区との間には有意な形態的差異はみられなかったが、ES、MS および LS stage 区と未処理区との間には有意な形態的差異がみられた ($p < 0.05$)。この ES、MS および LS stage 区は、低酸素処理の開始と終了時期は異なるものの、いずれも体節形成期といった胚発生段階で行った実験区であり、それぞれ区で外部形態が異なるものの、短軀症の特徴である体高が高く、躯間長が短いといった症状を呈した (Fig. III-1-5)。

d) 異常椎体の外部形状および内部構造

すべての実験区において40日間飼育した稚魚の透明骨格標本を作製し、脊椎骨を観察した結果、ES、MS および LS stage 区の個体の脊椎骨は、その他の実験区および未処理区の脊椎骨に比べて、顕著に椎体欠損による異常な脊椎骨が高率に観察された (Fig. III-1-6)。そして、その発生率はそれぞれ、95.0、100.0 および 58.0%であった (Table III-1)。一方、2B、G stages 区および対照区の稚魚では 2.0%と低率であった。

本実験でみられた異常な脊椎骨の外部形状は、前章にて述べた種苗生産で発生した異常と同様に、1つの椎体に複数対の神経棘と血管棘が付随していた。また、最も重度な症状では6椎体が

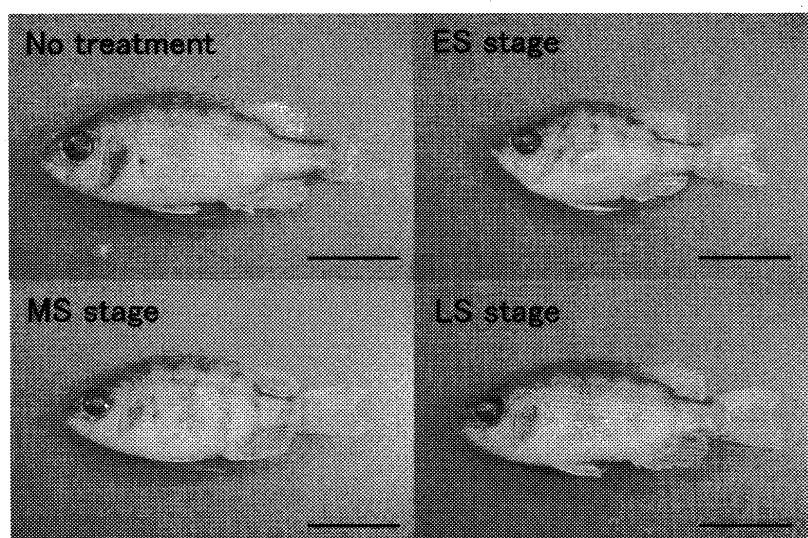


Fig. III-1-5. Examples of the external appearance in low oxygen treated and intact red sea bream juveniles. ES stage, MS stage, and LS stage were the period treated with low oxygen from three to 10 somites stage, 11 to 17 somites stage, and 18 to 24 somites stage, respectively. Bars in all pictures indicate 1 cm.

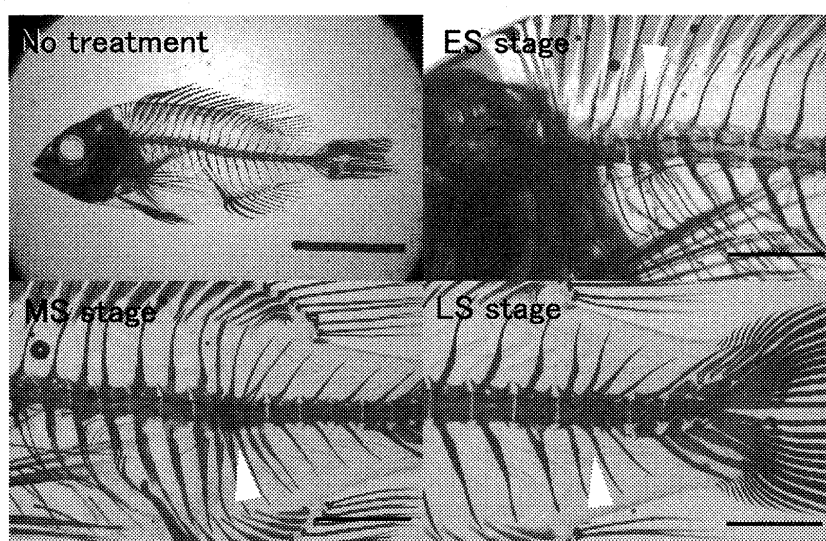


Fig. III-1-6. Examples of the external appearance of vertebrae in the low oxygen treated and not treated red sea bream juveniles. ES stage, MS stage, and LS stage were the period treated with low oxygen from three to 10 somites stage, 11 to 17 somites stage, and 18 to 24 somites stage, respectively. The samples were cleared and double-stained in the cartilages and ossified bones with alcian blue and alizarin red S. Arrow head shows the abnormal vertebra with the centrum defect. Bars in No treatment indicate 1 cm and ES, MS and LS stage indicate 250 μ m.

欠損し、合計では9つの椎体欠損個体があった。症状が重くなるほど椎体の数が減少したが、神経棘および血管棘の減少はみられなかった。本研究で検査したすべてのマダイ稚魚には脊椎骨の数は尾部棒状骨をいれて24椎体存在した。この結果より、異常な脊椎骨の外部形態は、前章の椎体欠損と同様の症状を呈した。

さらに、これら正常および異常椎体の硬組織切片を作製し観察した結果、正常な椎体の脊椎骨は正中線における組織像で観察すると鼓型をしている。本研究で誘導された椎体欠損症で見られる異常椎体においても、外部形状は複雑であり体軸方向に伸張しているが (Fig. III-1-6), 正常

椎体と同様に鼓型をしており、基本的な構造で差はみられなかった (Fig. III-1-7)。また、通常、椎体とその隣り合う椎体との間に靱帯が存在するが、異常椎体内部には、靱帯や骨組織の不連続面はみられなかった。この結果より、異常な脊椎骨の内部構造は、前章の椎体欠損と同様の症状を呈した。

以上の結果より、マダイにおける椎体欠損の原因の1つは、体節形成期の酸素不足であることが明らかとなった。

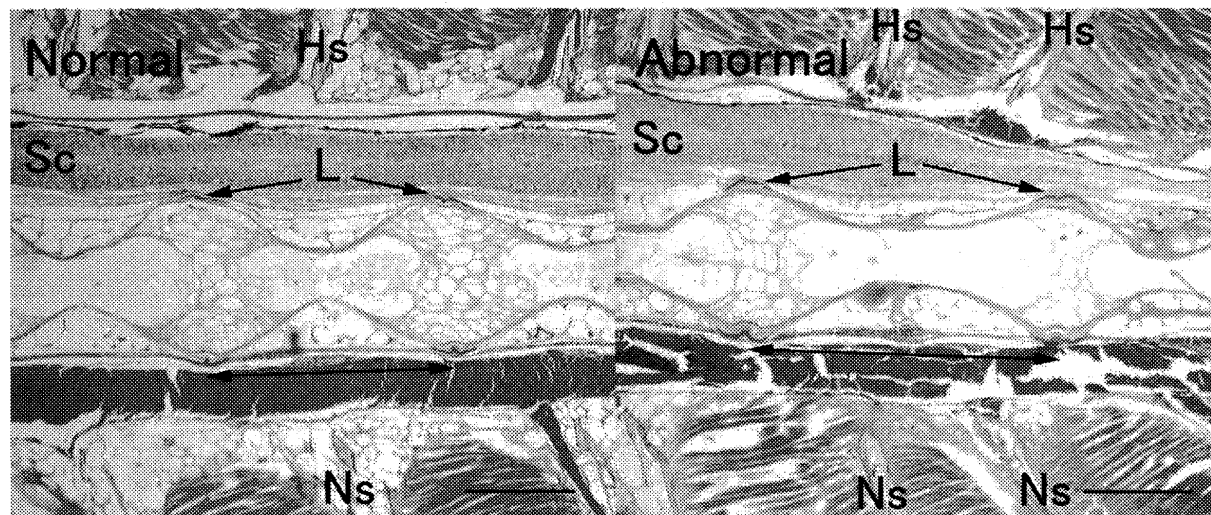


Fig. III-1-7. Sagittal sections showing the internal structure of normal and abnormal centra with centrum defects. They were stained with hematoxylin and eosin. One centrum is shown as region between the arrows. Sc; spinal cord, Ns; neural spine, Hs; heamal spine, L; ligament. Bars in both pictures indicate 0.5 mm.

e) 体節分節異常と椎体欠損との関係

本実験で発生した、体節分節異常と椎体欠損の2つの異常は、体節が形成される段階と低酸素処理を行った段階と完全に一致した。つまり、ES, MS および LS stage 区における仔魚の体節異常発生部位は、4~10 番目、11~18 番目および 18~23 番目の椎体で 50%以上の椎体の異常がみられ (Fig. III-1-8), また、稚魚の椎体欠損発生部位は、4~10 番目、11~18 番目および 18~20 番目の椎体で 30%以上の椎体の異常がみられた。発生率は両者で異なるものの、仔魚に観察された体節異常と稚魚にみられた椎体欠損の間には、有意な位置的相関が見られた ($p<0.05$)。一方、2Bstage, G stage および対照区には、体節分節異常および椎体欠損はほとんどみられなかった。

III-1-3. 考 察

a) 実生産への応用

本研究ではマダイ種苗生産過程で高率に発生する椎体欠損について、マダイ卵を低酸素処理することにより椎体欠損の誘導を試みた。その結果、体節形成期に処理した区のみで高率に椎体欠損が発生し、胚発生時の低酸素が椎体欠損の原因の1つであることが明らかとなった。これまでに多くの魚類の脊椎骨異常が研究されているものの、その原因を明らかにした研究は数少ない。例えば、ヒラメにおける all-trans レチノイン酸の影響³²⁾、過度の遊泳行動による前弯症⁴⁸⁾、ニジ

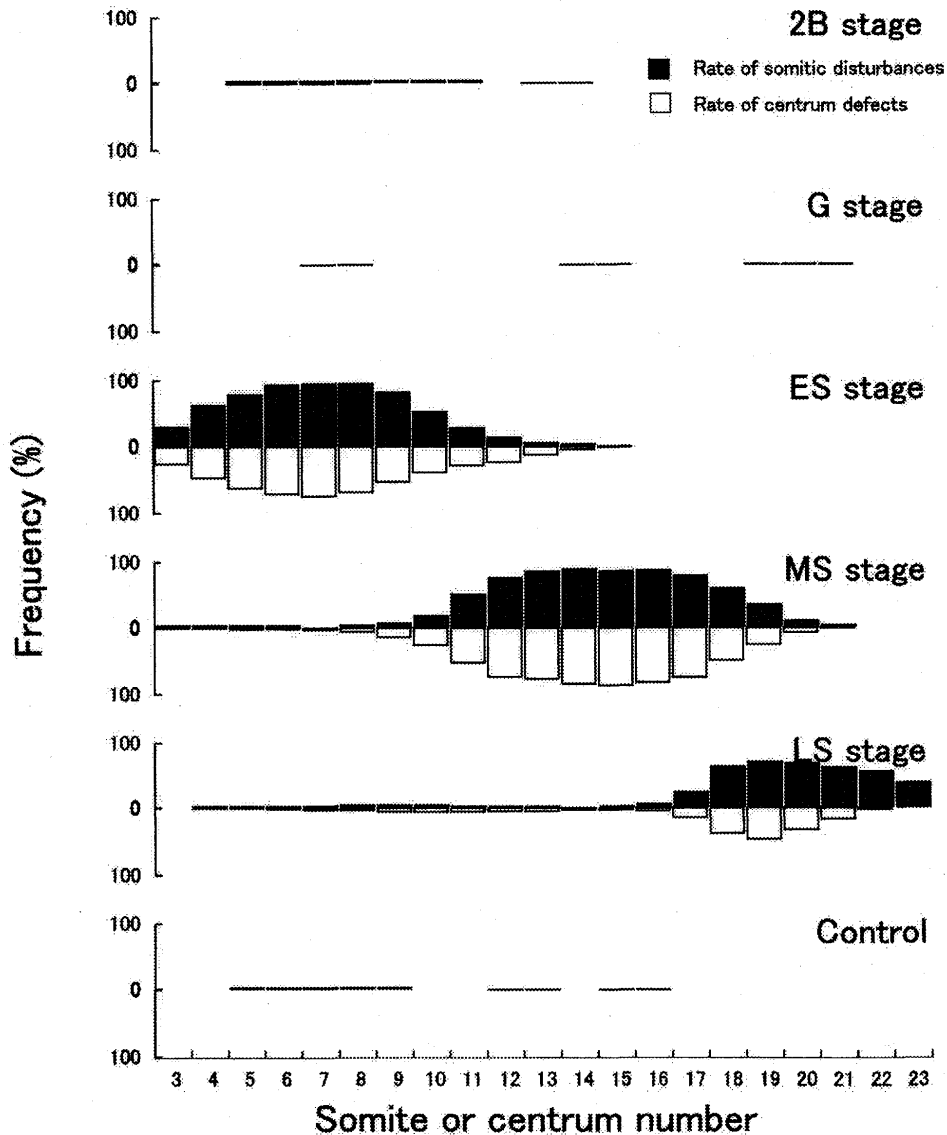


Fig. III-1-8. The frequency distribution of somitic disturbances and centrum defects in the low oxygen treated and not treated red sea bream larvae and juveniles from 3rd to 23rd somite. 2B stage, G stage, ES stage, MS stage, and LS stage were the period treated with low oxygen from the two cell stage to blastula stage from 1.0 to 7.0 hours after spawning, gastrula stage from 9.5 to 15.5 hours, three to three to 10 somites stage of 17.5 to 23.5 hours, 11 to 17 somites stage of 24.5 to 30.5 hours, and 18 to 24 somites stage 32.5 to 38.5 hours after fertilization, respectively. A significant correlation was found between the location of somitic disturbances in newly hatched larvae and that of centrum defects in juveniles (Spearman's rank correlation test, $p < 0.05$).

マスにおける細菌感染による脊椎骨癒合^{36,37)} などである。さらに、実際の生産現場において形態異常に対して有効な防除策を講じ得るものは、鰾の無開腔による脊椎骨の前弯^{2,46,47)} や、飼料中のビタミンC欠乏による脊椎骨の屈曲^{18,77)} など非常に少なく、本研究は、生産現場にて対応できる数少ない研究の1つであると言える。具体的な応用方法は、本研究において、仔魚における体節異常と稚魚における椎体欠損との間に有意な位置的相関がみられた。そして、低酸素処理を行う発生時期をずらせば、孵化仔魚の体節分節異常および稚魚の椎体欠損の発生位置が後方にずれることも示された。これらの結果から、仔魚の体節分節異常は椎体欠損の前駆症状であることが

示唆され、養殖用種苗における椎体欠損の発生率を孵化仔魚の段階で予測する事がおよそ可能となると考えられる。したがって、この技術により産業規模での種苗生産において、形態異常を有する種苗を長く飼育することが回避でき、結果的にはコスト削減につながるものと思われる。卵の培養や輸送時には、本研究で示されたような飼育水中の溶存酸素濃度や、飼育水温といった飼育環境を注意深く適切な値に保つことが必要である。このような因果関係は、他の魚種においても共通のものであると考えられるため、非常に幅広く利用することができ、本研究は、実際の種苗生産リスク回避の面で貢献できる研究であると言える。

b) 椎体欠損のメカニズム

本研究では、溶存酸素濃度 10~15% という低酸素に曝露させることにより椎体欠損が発生した。一般に、脊椎動物の椎体は硬節から形成されることが明らかとされている⁷⁶⁾。硬節を形成する細胞は、その前に形成される体節に由来し、脊索の周りへと移動・凝集し、骨化する（椎体は軟骨を経ずに骨化する膜性骨化骨である）。哺乳類や鳥類、爬虫類、両性類については、硬節（Sclerotome）が形成されその後、それぞれの前半部分と後半部分が別れ、再び前硬節と後硬節とが結合（再分節）し、脊椎骨を形成するといわれている。しかし、メダカを始めとする魚類の脊椎骨形成過程には、脊椎骨の雛形となる軟骨は見られず、脊索の周囲に直接、骨形成が進行する。しかしながら、硬節に相当する組織が存在し、その細胞が脊索の外周へと移動することが観察されている⁷⁷⁾。ヒラメでは脊椎骨を形成する前駆細胞は胚期に発生する体節に由来し、仔魚初期のあいだは脊索の周囲に未分化のまま維持され、仔魚中期になると細胞増殖を始めて、脊椎骨を形成すると考えられている⁷⁸⁾。これらのことから、低酸素などの悪条件下になると、体節細胞でなんらかの異常が発生し、体節から分化する皮節、筋節および硬節様細胞に何らかの異常が生じるが、低酸素はこれらの分化に支障をきたすほどの刺激ではないため、異常な硬節はそのまま椎体へと分化し、そして最終的に椎体の異常となって現れるものと考えられます。近年の研究では、硬骨魚類において、体節形成期あるいは体節形成に続いて起こる硬節の形成と脊椎骨形成の密接な関係が示されている⁷⁹⁾。また、ヒートショックによって体節の分節異常が起こることがゼブラフィッシュで報告されている⁸⁰⁾。したがって、これらの報告からも、環境要因が硬骨魚類における胚発生期の体節分節を攪乱し、孵化後の脊椎骨形成において椎体の形成に異常を生じさせる可能性がある。このような椎体形成異常発症のメカニズムの詳細な研究は、今後の課題である（第IV章2節参照）。

c) 椎体欠損の発生部位

本実験で誘導された短軀症は、症状が同じ程度でありながら、異常の場所によって大きく外部形態が変化している。先の研究では Fig. III-1-5 にみられる短軀症のなかで ES stage 区の形態を持った異常が多くみられた。つまり、種苗の椎体欠損の発生部位は、7番目から10番目の腹椎後半に集中していた。この原因については明らかでなかった。しかし、本実験では椎体欠損は体節形成期において、低酸素処理を行った時期に対応していたという結果がえられた。具体的な例では、第10体節形成期の胚に低酸素処理を行えば、わずかにずれる傾向があるものの、孵化仔魚の体節分節異常は第10体節付近で発生し、稚魚ではおよそ10番目の椎体で欠損が起こる。したがって、この結果から種苗生産で発生した椎体欠損は、前節の7番目から腹椎後半の椎体に対応する体節が形成される時期に、酸素不足になったのではないかと考えられる。生産現場では、作業時間上、受精卵回収や浮上卵と沈下卵の分離作業などがこの段階で行われていることがある。

そのため、これら作業中における酸素濃度の変化を調べる必要がある（第IV章1節参照）。

第2節 胚発生期の高水温処理による影響

Ⅲ-2-1. 材料および方法

a) 供試卵

大島事業場にて養成された平成11年産マダイ親魚群より、平成15年8月27日から平成15年9月20の25日間に自然産卵した受精卵を用いた。受精卵は実験に用いるまでの間、水温19℃、溶存酸素濃100%で培養した。この実験で用いた卵は、発生段階を一致させるため、数分の間に産卵された受精卵のみを回収して用いた。本実験に供した受精卵において、未処理の場合の孵化率は平均で95.3%であり、25日間の実験期間中ほぼ差はみられなかった。

b) 高水温処理

10体節前後まで培養した卵は、ステンレス製ネットを用いて約300粒取り出し、市販のヒーターおよびクーラーにて水温調節した処理海水に入れて高水温処理を行った。高水温処理は、どの程度の水温刺激が体節形成や孵化に影響を及ぼすかが不明なため、短い接触時間と長い接触時間の2通りについて、水温と接触時間を変えて行った。短い接触時間の処理では、10段階（1, 5, 10, 20, 30, 60, 120, 180, 240, 300秒）の時間を設けて高温処理を行った。また、長い接触時間の処理では、7段階（5, 10, 15, 30, 60, 120, 180分）の接触時間を設けて処理を行った。処理海水の水温は、短時間処理では、卵培養水温である19, 24, 29, 34, 39, 44および49℃の6段階、長時間処理では、21, 23, 25, 27, 29および31℃の6段階設定した。高温処理を終えた受精卵は、500 ml ビーカーに約100粒ずつ収容し、孵化までの間、水温19.0℃、溶存酸素濃度約100%で培養した。本実験で供試した卵は、25日間の産卵で得られたため、未処理（0分）のものも同様に培養し卵質を比較した。

c) 分析

卵質と初期の異常を観察するために、実験区ごとに正常孵化率、異常孵化率および沈下卵率孵化を測定した。測定時に孵化はしているが死亡している個体は異常孵化率に含めた。また、孵化後1日令の仔魚の体節異常を観察するため、各実験区20尾を生物顕微鏡および実体顕微鏡を用いて観察を行なった。

Ⅲ-2-2. 結 果

a) 高温刺激の孵化への影響

短時間処理において、水温差24℃の高温処理では、1～300秒まで正常孵化率にほぼ差はみられなかった（Fig. Ⅲ-2-1）。しかし、29℃以上では、接触時間が長くなるほど、正常孵化率は減少し、49℃の高温処理では、すべての設定区において正常な孵化が得られなかった。対照的に、沈下卵率は、接触温度が高くなるにつれて上昇し、49℃の高温処理では、すべての設定区においてほぼ100%となった。

長時間処理においては、24℃の高温処理では、15～180分まで正常孵化率にほぼ差はみられなかった。しかし、短時間処理と同様に25℃以上では接触時間が長くなるほど、正常孵化率は減

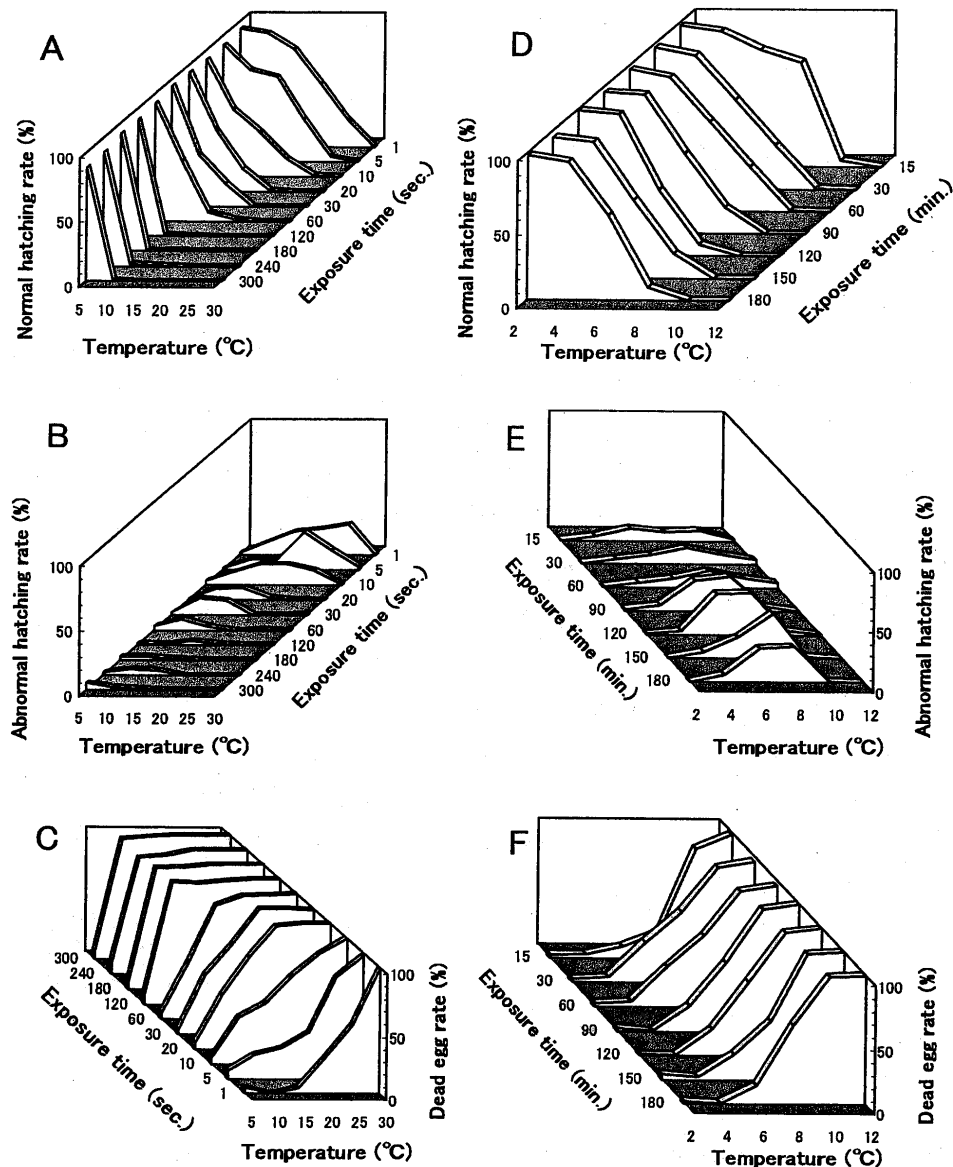


Fig. III-2-1. Normal hatching rate, abnormal hatching rate and dead egg rate in which exposed to high temperature under various incubation temperature and exposing time. A, B and C; short time experiment. D, E and F; long time experiment. Temperature in all graphs indicates difference of temperature between treatment and rearing temperature.

少し、31℃の高温処理では、すべての設定区においてほぼ0.0%であり、沈下卵率は、すべての設定区においてほぼ100%であった。このように、ある温度を超えると2~4℃という比較的狭い温度幅で急激に正常孵化率が減少した。

本実験では、脊索が弯曲した異常孵化 (Fig. III-2-2) がみられたものの、すべての設定区において孵化仔魚の体節分節異常はみられず、処理温度が低温であればそのほとんどが正常孵化し、処理温度が高温であれば死亡した。

II-2-3. 考 察

本実験では、環境要因としての水温刺激が椎体欠損の原因であるのかを確かめるため、体節形成期に様々な温度と接触時間を設けて高温処理を行った。その結果、いずれの設定区においても

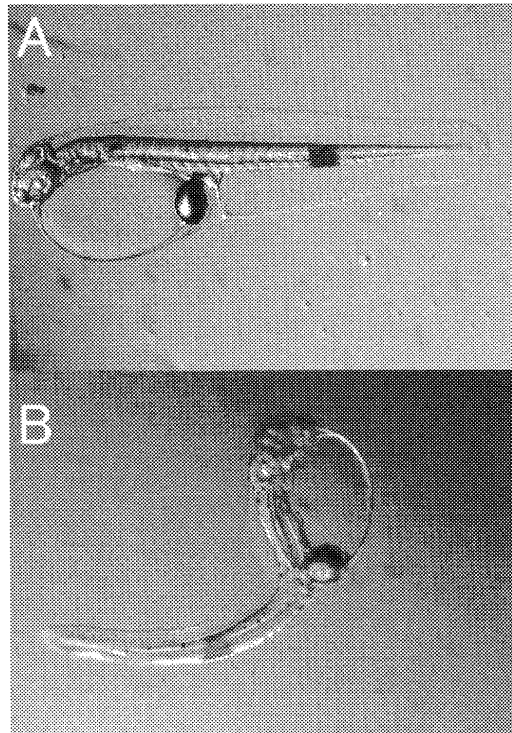


Fig. III-2-2. Effects of high temperature on hatching. A; Normal larvae, B; Abnormal larvae. Bar indicate 5 mm.

体節異常はみられず、高水温刺激はマダイにおける椎体欠損の発生要因ではないことが示唆された。

水温刺激による脊椎骨異常は、孵化期の高および低水温による椎体癒合の発生例がウグイにおいて報告されている⁴⁰⁾。また、ゼブラフィッシュでは体節形成期に高水温処理をすることで、体節の異常が誘導されることが報告されている⁸⁰⁾。接触温度および接触時間ともウグイやゼブラフィッシュと同様の処理を行っているにもかかわらず、本実験では体節の異常が発生しなかった。この理由について、現在水温の影響により形態異常が有機されるという報告の多くは淡水性の魚種であり、海水性の魚類とでは低酸素や高温といった環境ストレスに対する耐性が異なり、その結果マダイでは高温刺激で体節異常が発生しなかった可能性も考えられる。つまり、低酸素による形態異常のメカニズムと高水温による形態異常のメカニズムは異なる可能性があるため、椎体欠損の前駆症状として体節異常が生じない可能性も考えられる。それゆえ、高温刺激による椎体欠損の発生の確証を得るためには、処理後、継続して飼育を行う必要があると思われる。

これまでにヒラメ、シマアジおよびスズキなど多くの魚種において、高水温に対する感受性について報告され⁸¹⁻⁸³⁾、マダイ⁸⁴⁾では、2~4細胞期および胚体出現期から原口閉鎖期に高温感受性が高いことが報告されている。特にメダカでは、水温刺激に対して感受性が高い時期が存在し、脊椎骨の異常を起こす時期が非常に限定されることも報告されている⁶⁷⁾。マダイでも同様に、感受性が高い時期での高温接触によって椎体欠損が発生する可能性も考えられる。したがって、温度感受性が高い時期での高温接触について、今後検討する必要があるのかもしれない。

第IV章 椎体欠損による短軀症の防止に向けて

前章において、体節形成期における低酸素環境が椎体欠損の原因の1つであることが明らかとなった。しかしながら、実際の養殖現場でこの情報を利用するためには、どの程度の酸素濃度でどの程度の時間低酸素にさらされると椎体欠損による短軀症が発生するのかを明らかにする必要がある。そこで本章の1節では、輸送や卵回収などにおいて受精卵が密集した場合を想定し、まず、マダイ卵の酸素消費量を測定し、密集時における溶存酸素濃度の変化を予測するとともに、小規模なモデルでの溶存酸素濃度の測定を行った。第2節では濃度と処理時間を変えて低酸素処理を行い、椎体欠損の発生率を測定した。

第1節 マダイ胚発生期の酸素消費量

IV-1-1. 材料および方法

a) 供試卵

1999年に人工孵化し、近畿大学水産研究所で養成したマダイ親魚（雄40尾、雌100尾、平均体重3.5kg）から自然産卵により2003年9月12日から9月21日の10日間に得られた卵を供試した。実験期間中、採卵親魚の飼育水温は19.0℃に維持した。

b) 実験装置

酸素消費量を測定するために、ガラス製円筒呼吸室（1.65 ml）を自作した（Fig.IV-1-1）。呼吸室の水温は、ウォーターバスにて温度調節を行った水を、水中ポンプにより循環させることによって一定に維持した。溶存酸素濃度測定の間、供試卵が呼吸室上部に密集することによる局所的な溶存酸素濃度の低下を防ぐため、呼吸室の下にスターラーを設置し、マイクロ回転子を呼吸室内にて一定速度で回して培養水を攪拌した。溶存酸素濃度の測定には溶存酸素濃度測定機（YSI model 5300, YSI Co. Ltd.）を用いた。

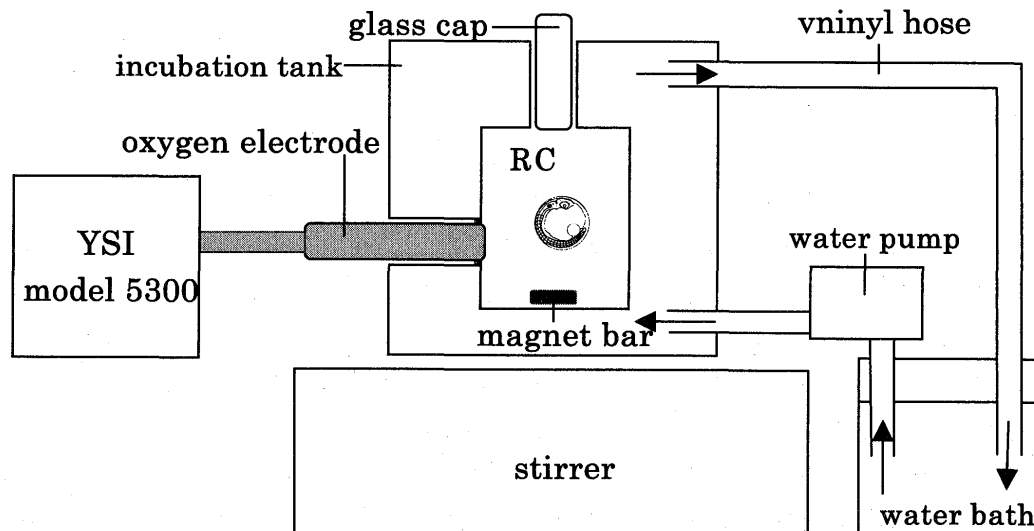


Fig. IV-1-1. Apparatus setup of the respirometry. Arrows indicate the current direction of the temperature controlled water.

c) 実験条件

異なる水温でのマダイ卵の酸素消費量を明らかにするために、溶存酸素濃度の測定は、産卵水温の下限である 16℃、産卵最適水温である 19℃、および産卵水温の上限である 22℃の 3 水温で行った。採卵親魚から得た受精卵（卵割前～4 細胞期）は、2 細胞期から 8 細胞期の間に発育するまで、16℃、19℃、および 20℃の海水に馴致させ、実験に供する発生段階まで各水温にて培養した。呼吸室内の培養海水には、溶存酸素の飽和海水（酸素飽和度約 100%）を用い、測定開始時に酸素飽和度が 90%以上になるようにした。また、測定終了時には酸素飽和度が 50%を下回ることのないよう呼吸室に入れる卵数を調節した。

d) 酸素消費量の測定

マダイ胚発生各期における酸素消費量を明らかにするため、桑実胚、胞胚、囊胚、胚体出現、クッパー氏胞出現、6-8 体節形成、13-15 体節形成、20-22 体節形成、心臓拍動、孵化直前（孵化開始より約 1 時間前）、孵化直後（供した卵のうち約 5%が孵化した時間）の 11 発生段階で測定を行った。各発生段階に達した卵および仔魚はガラス製円筒呼吸室に、約 100 個体から 1000 個体入れ、10 分から 15 分間測定し、1 回の測定ごとに卵を入れ替えて計 6 回の測定を行った。また、これに加えてそれぞれの発育段階について 1 回のブランクテストを行った。測定終了時、すべての卵が浮上している、すべての卵および仔魚の心臓が拍動している、あるいは、すべての仔魚が生存していた場合においてのみ、測定結果を呼吸分析に使用した。測定によって得られた結果は、水温と海水の酸素飽和量との関係表⁸⁵⁾ およびガス濃度諸単位間の換算表⁸⁶⁾ をもとに卵 1 粒または仔魚 1 尾あたりの酸素消費量 ($\mu\text{l/ind/min}$) を算出した。

e) 卵の密集時における溶存酸素濃度の推移

受精卵が密集した場合、密集層の溶存酸素濃度はどのように低下するのかを調べるため、500 ml ビーカーに溶存酸素の飽和海水（酸素飽和度約 100%）とともに約 16 万粒の体節形成期の受精卵を入れ、（浮上卵の密集層が約 1.8 cm）測定を行うまで、エアレーションを行い、溶存酸素濃度約 100%、水温 19℃に維持した。酸素電極は浮上卵層のほぼ中央（水面から約 0.9 cm の深さ）になるよう高さを調節して設置し、溶存酸素濃度の推移を測定した（Fig. IV-1-2）。溶存酸素濃度測定には、溶存酸素濃度測定機（YSI model 5300, YSI Co. Ltd.）を用いた。

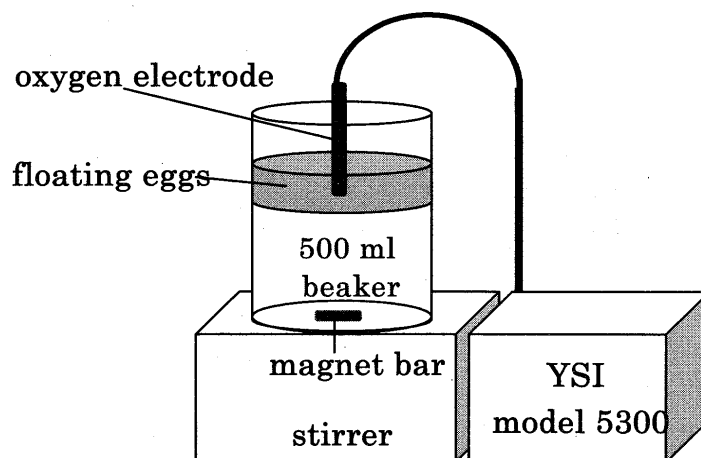


Fig. IV-1-2. Apparatus setup of the respirometry.

IV-1-2. 結 果

a) 供試卵

培養温度 16℃, 19℃, および 22℃では, 孵化までに要した時間は, それぞれ 65.0, 45.0, および 30.0 時間であった (Table IV-1-1)。10 日間の実験に供した卵の卵径にほとんど変化なく, 胚体出現期における卵径は 0.90 ± 0.01 SD mm であった。孵化率は, 16℃, 19℃, および 22℃において, それぞれ 94.3-98.6%, 90.0-94.4%, および 99.0-96.8% であった。また, 水温馴致後の卵の孵化率は, それぞれ 96.1-98.2%, 95.3-100.0%, および 96.8-98.2% であり, 産卵水温から各実験水温への馴致による孵化への影響は見られなかった。

Table IV-1-1. Time after spawning to each developmental stage under different incubation temperatures in the red sea bream eggs

Developmental stages	Time after spawning (h)		
	16℃	19℃	22℃
Morula stage	4.0	3.0	2.5
Blastula stage	7.0	5.0	4.5
1/2 yolk is covered with blastodisk	19.0	13.0	9.5
Embryo formation	24.0	17.0	11.5
Kupffer's vesicle appear	28.0	19.0	14.5
6-8 myotomes formation	35.0	23.0	15.5
13-15 myotomes formation	41.0	27.0	18.5
19-21 myotomes formation	44.0	30.0	22.0
Heart beating	55.0	37.0	24.5
Just before hatching	61.0	43.0	28.0
Just after hatching	65.0	45.0	30.0

b) 酸素消費量

マダイの酸素消費量は, いずれの水温においても, 桑実期から胚体出現期まで増加した後, クーパー氏胞出現期において停滞し, 再び体節形成期から孵化直後まで増加するといった同じ傾向が見られた (Fig. IV-1-3)。

一元配置分散分析およびポストホックテストとして Fisher の PLSD 法を用いた統計解析の結果, 22℃での単位時間当たりの酸素消費量は, すべての发育段階において 16℃および 19℃より有意に多いことが認められた ($p < 0.05$)。16℃と 19℃との比較では, 囊胚, 胚体出現, 20-22 体節形成, 心臓拍動, 孵化直後のみで有意な差が認められた ($p < 0.05$)。

各水温における単位時間当たりの酸素消費量 (y ; $\times 10^{-4}$ μ l/ind/min) と胚発生時間 (T ; h) は, 以下の回帰直線で高い相関係数を持って表された。

$$16^\circ\text{C} : y = 0.1125 \times T - 0.1955 \quad (r = 0.9634)$$

$$19^\circ\text{C} : y = 0.203 \times T - 0.1214 \quad (r = 0.9662)$$

$$22^\circ\text{C} : y = 0.3793 \times T + 0.4171 \quad (r = 0.9679)$$

この式をもとに桑実胚から孵化までの卵 1 粒あたりの総酸素消費量を算出すると, 16℃, 19℃, および 22℃では, それぞれ 1.35, 1.20, および 1.09 μ l であり, 水温の上昇とともに総酸素消費量は減少した。逆に, 単位時間当たりの酸素消費量は, それぞれ, 3.67, 4.67, および 6.67 μ l/

ind/min であり、水温の上昇とともに増加することが推定された。

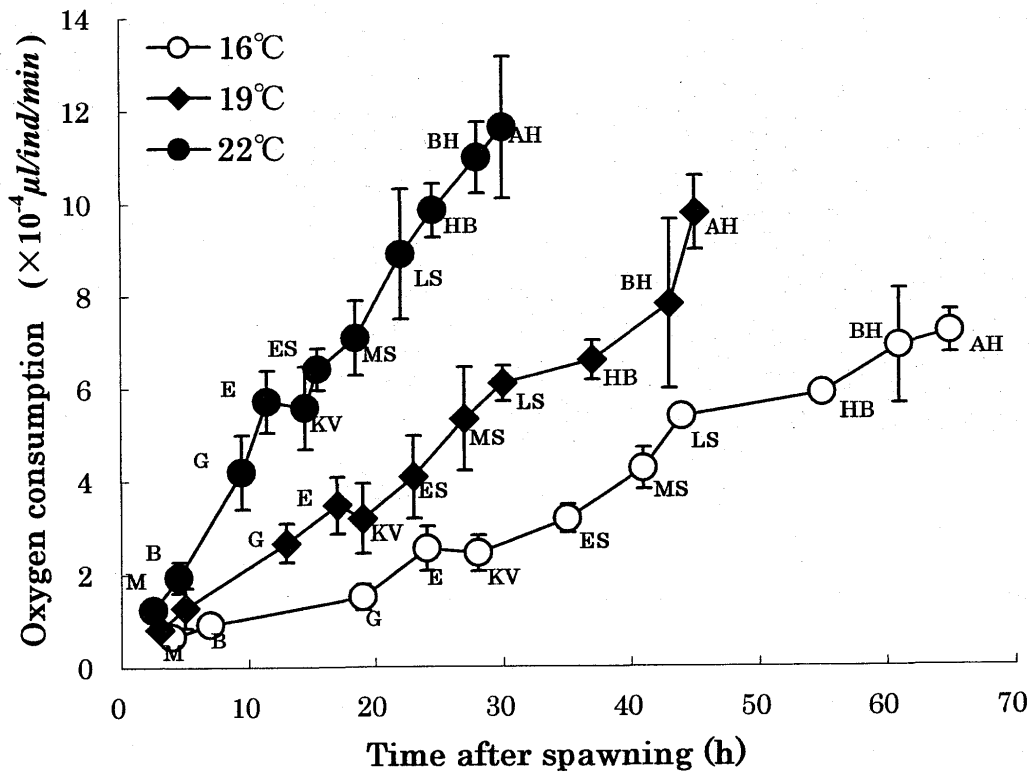


Fig. IV-1-3. Relationship between water temperature and oxygen consumption (μ l/ind/min.) of red sea bream. Vertical bars show standard deviations. Abbreviations of developmental stage: Mo, morula; B, blastula; G, half of yolk is covered with blastodisk; E, embryo appearance; KV, Kupffer's vesicle appearance; ES, early phase of somitogenesis with six to eight somites; MS, medium phase of somitogenesis with 13 to 15 somites; LS, late phase of somitogenesis with 20 to 22 somites; HB, heart beating; BH, just before hatching; AH, just after hatching.

c) 卵の密集時における溶存酸素濃度の推移

測定開始後 30 秒では、エアレーションによってできた水流によって受精卵が攪拌されていたが、60 秒後では、その水流が収まり一部の受精卵が浮上層を形成した (Fig. IV-1-4-C)。さらに 90 秒後ではその多くが浮上し (Fig. IV-1-4-D)、120 秒後には、一部の受精卵がビーカーの中層に停滞していたものの、そのほとんどが浮上して酸素電極が受精卵の密集層に完全に埋没した (Fig. IV-1-4-E)。酸素電極が密集層に埋没すると同時に、溶存酸素濃度は急激に低下し、測定開始後約 7 分では溶存酸素濃度が約 3% となりその後は一定であった。この実験結果から、マダイの受精卵はわずかな時間で密集層を形成し、密集層の酸素濃度は急激に低下することが明らかとなった。

III-1-3. 考 察

a) 酸素消費量

単位時間当たりの酸素消費量は魚種によって異なり、また、同一の魚種でも水温、塩分、溶存酸素濃度や体重、測定時の状況など種々の要因によって大きく変わることも知られている^{87,88)}。魚類では、その胚発生が水温の影響を大きく受ける。これまでにマダイの胚発生におよぼす水温

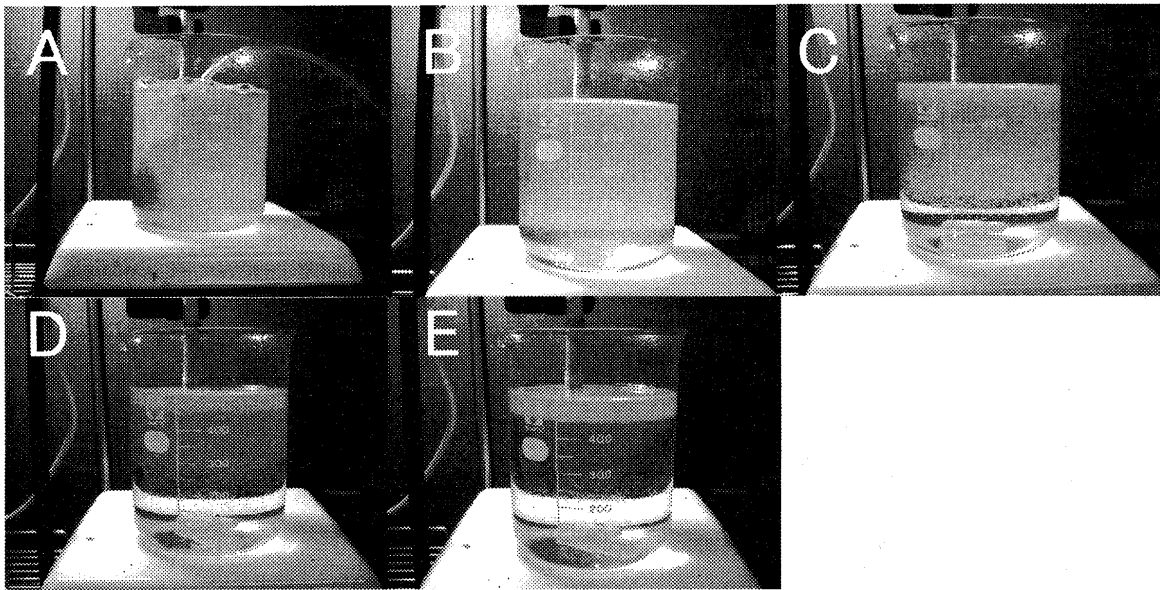


Fig. IV-1-4. The process of formation of floating egg dense layer. A: just before start of experiment, B: after 30 sec., C: after 60 sec., D: after 90 sec., E: after 120 sec.

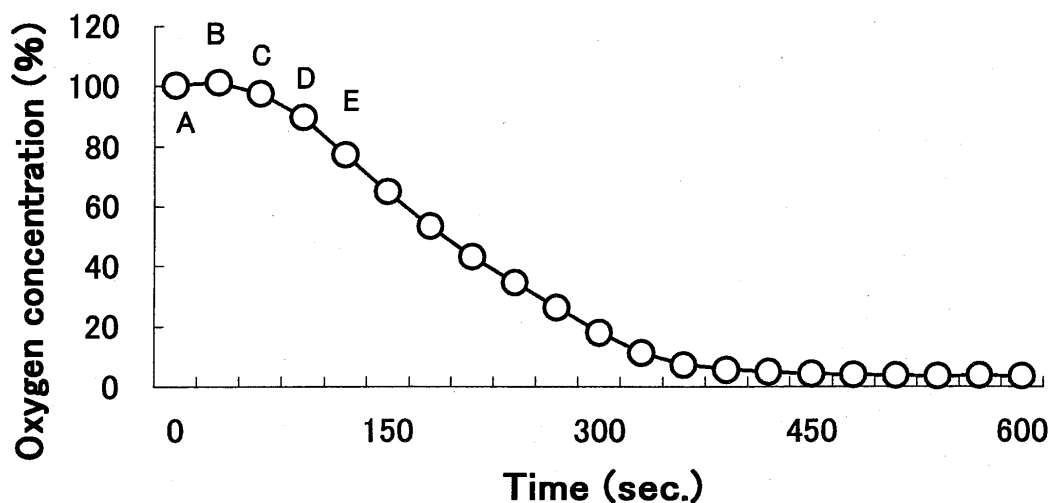


Fig. IV-1-5. Dissolved oxygen concentration in high density layer of floating eggs. A, B, C, D and E in graph each corresponds with the condition of eggs of A, B, C, D, and E in Fig. IV -1-4 respectively.

の影響に関して木下および道津⁸⁴⁾、瀬岡⁸⁹⁾が報告している。本研究では、マダイ胚発生期における平均酸素消費速度は水温の上昇に伴って増加することが明らかとなった。また、その測定値からの推定により、卵1粒あたりの孵化までの総酸素消費量は水温の上昇に伴って減少することが推定された。これについては以下のように説明される。単位時間当たりの酸素消費量は胚の発生速度に大きく関係し、同じ測定時間では培養温度が高いほど発生が早く進むため、それだけ高い代謝を可能にする高い酸素消費量が必要と考えられる。一方低い培養水温では、発生に要する時間が長く、孵化までの基礎代謝に必要な酸素消費量が、高い培養水温での短い時間の場合に比べて、かなり多く必要とされ、その結果総酸素消費量がより多くなると考えられる。

また、胚発生期の単位時間当たりの酸素消費量の増減は、胚発生のための主な内部栄養源として利用される遊離アミノ酸 (FAA) の増減と一致することがマダイにおいて報告されている⁹⁰⁾。

これまでに報告されているマダイ胚発生期における FAA の増減の様相⁸⁹⁾ は、本研究における酸素消費量の増減の傾向と良く一致した。したがってマダイの胚発生においても FAA が主な内部栄養源の 1 つと考えてよいであろう。

これまで胚発生期における酸素消費量が報告されたヘダイ⁹⁰⁾ およびクロマグロ⁹¹⁾ では、胞胚期でそれぞれ約 $3.7 \times 10^{-4} \mu\text{l/ind/min}$ (18°C) および $5.0 \times 10^{-4} \mu\text{l/ind/min}$ (25°C) であり、マダイ胞胚期の酸素消費量である $1.3 \times 10^{-4} \mu\text{l/ind/min}$ (19°C), $1.9 \times 10^{-4} \mu\text{l/ind/min}$ (22°C) と比較するとそれぞれ約 2.85 倍および 2.63 倍であった。また、孵化直前では、それぞれ $14.9 \times 10^{-4} \mu\text{l/ind/min}$ (18°C) および $40.0 \times 10^{-4} \mu\text{l/ind/min}$ (25°C) であり、マダイの酸素消費量である $7.8 \times 10^{-4} \mu\text{l/ind/min}$ (19°C), $11.0 \times 10^{-4} \mu\text{l/ind/min}$ (22°C) と比較するとそれぞれ約 1.9 倍および 3.6 倍であった。これらの違いは以下のように説明される。

まず生物量の違いが単位時間当たりの酸素消費量の種間差を説明する。ヘダイおよびクロマグロの卵径は、それぞれ 1.02 ± 0.03 および $1.02 \pm 0.04 \text{ mm}$ であり、マダイの卵径である $0.90 \pm 0.01 \text{ mm}$ に比べ大きく、体積では約 1.46 倍である。したがってヘダイとクロマグロでは、卵の生物量が多いため酸素消費率も高かったと考えられる。次に培養水温の違いも種間差を説明する。クロマグロ卵の培養水温は、マダイの培養水温である 19°C に比べると 6°C 高く、高温による代謝促進も単位時間当たりの酸素消費量を高くする要因となったであろう。

クロマグロでは単位時間当たりの酸素消費量が孵化直前で急激に増加し、胞胚時に比べ約 40 倍に達することが報告されており⁹¹⁾、孵化直前まで直線的に単位時間当たりの酸素消費量が増加するヘダイやマダイとは著しく異なっている。魚類では一般に水温が高いほど囊胚以降の発生スピードが速くなり、クッパー氏胞出現期以降はさらに早まることはよく知られ⁹²⁾、クロマグロの場合、胚発生の後期では、マダイおよびヘダイに比べより活発な細胞分裂や細胞の分化、器官原基の形成がなされることによる酸素消費量の増加があると考えられる。

b) マダイ種苗生産技術への提言

マダイは日本における代表的な養殖魚種であり、他の多くの魚種の種苗生産の基本的な技術やそれに用いられる施設はこれを基準としている。しかしながら、その技術は完成されたものとは言えず今後もこれらの改善が必要である。マダイの採卵においては、良質卵を得るために受精卵の浮上卵と沈下卵への分離を一般的に行っている。卵の分離作業においては、30 l 容円型容器などの比較的小型の容器が用いられる。産卵親魚から一度に得られる卵数は、数十万から数百万の単位であり、浮上卵と沈下卵の分離の際、水面に集積した浮上卵の厚さが数 cm に達することもまれではない。このとき、浮上卵の層の中央部では、卵による酸素消費のため急激に溶存酸素濃度が低下することが考えられる。さらに、夏期における分離作業では、外気温が 30°C 以上に達し、分離に使用する海水の温度上昇に伴う、さらなる酸素消費の増加が懸念される。

本研究結果を基に試算してみると、マダイ浮上卵が密集した層の海水 1 ml には 1400 粒以上の卵が存在し (卵径を 0.9 mm として)、その卵の総体積は 535 μl となる。したがってその層内の間隙に存在する水の体積は、465 μl となる。仮にこの間隙水が、最初水温 19°C 下で溶存酸素濃度 100% であったならば、6-8 体節形成期の卵が集積層を形成したとすると、その酸素消費速度は、 $4.07 \times 10^{-4} \mu\text{l/ind/min}$ であるから、間隙水中のすべての酸素を消費する時間は、わずか 9.3 分となる。魚類における酸素消費量は、環境水の酸素飽和度が低下しても、あるところまでは正常の値を維持するが、さらに低下すると減少することが知られている⁸⁸⁾。また、間隙水中の溶存

酸素濃度が低下した場合、浮上卵層に接する外気および低層の海水から酸素供給があるため、溶存酸素を消費しつくすまでの時間は9.3分より長くなる可能性も考えられる。しかしながら、本実験で行った浮上卵の密集層における溶存酸素濃度の低下速度は、密集時よりおよそ5分間で3%前後となった。これは、先にも述べたが、卵の大きさや測定方法によって生じた差と思われるが、いずれにしても、非常に短時間で低酸素の状態になることが推察される。このように卵が静置された場合、急激に低酸素状態になることは、浮上卵と沈下卵の分離作業時だけでなく、卵輸送の時でも輸送容器内での海水の攪拌が行われない場合は十分に起こり得る現象である。したがってこのような過程では、溶存酸素濃度の管理に十分注意をはらう必要がある。

第2節 胚発生期の低酸素処理濃度と処理時間

IV-2-1. 材料および方法

a) 供試卵

近畿大学水産養殖種苗センターすさみ事業場内98トン水槽で飼育されたマダイ親魚群より、平成15年10月18, 19, 21, 22, 23, 25, 26日に自然産卵により得られた受精卵を供試した。マダイ親魚群は、メスは1998年産春季人工孵化7尾、1998年産秋季人工孵化14尾、2001年産春季人工孵化14尾の計35尾から成り、平均魚体重はそれぞれ5.0, 5.0および2.5kgであった。また、オスは1997年産春季人工孵化4尾と2000年産春季人工孵化16尾の計20尾から成り、平均魚体重はそれぞれ5.1および2.6kgであった。これらマダイ親魚群には生殖腺刺激ホルモン(ゴナトロピン10000, 株式会社イセイ)を魚体重1kgあたり2000 IU投与した。産卵水温は約19.5℃であった。

得られた受精卵は、各日とも朝に採卵し、発生段階は囊胚後期でほぼそろっていた。卵は20L容器に収容後、エアレーションで攪拌しながら近畿大学水産研究所大島実験場に輸送し(DO約95%, 水温19.5-20.0℃), 500Lポリカーボネイト製円型水槽(以下, 500Lパンライト)に張ったネットに収容し、体節形成期(10体節前後)までの間、水温19.0℃で培養した。また、採卵日による卵質を比較するために、正常孵化率および沈下卵率を調べた。

b) 低酸素処理

10体節前後まで培養した卵は、海水2Lと共にポリ袋に収容し、海水に窒素ガスを通気させて6段階のDO(0, 10, 25, 50, 75, 100%)に調節し、7段階の時間(5, 10, 30, 60, 120, 240, 360分), 合計42区設定し低酸素処理を行った。処理中の水温を維持するため、500Lパンライトをウォーターバスとして使用し、ポリ袋内の調節海水の水温を19.0℃に保った(Fig. IV-2-1)。また、いずれの処理も重複して行った。DOの調節にはDOメーター(YSI Model 55, YSI/Nanotech Inc., Yellow Springs, U.S.A.)を用い、10分間で設定DOになるように調節した。

各設定時間まで処理した卵は、ステンレス製ネットを用いて取り出し、500mlビーカーに約300粒ずつ収容し、孵化までの間、水温19.0℃, DO約100%で培養した。本研究で供試した卵は、7日間の産卵で得られたため、各日の未処理(0分)の卵も同様に培養し卵質を調査した。

c) 飼育

本研究では、先の研究結果である体節分節異常と椎体欠損の発生との関連を再確認するため、

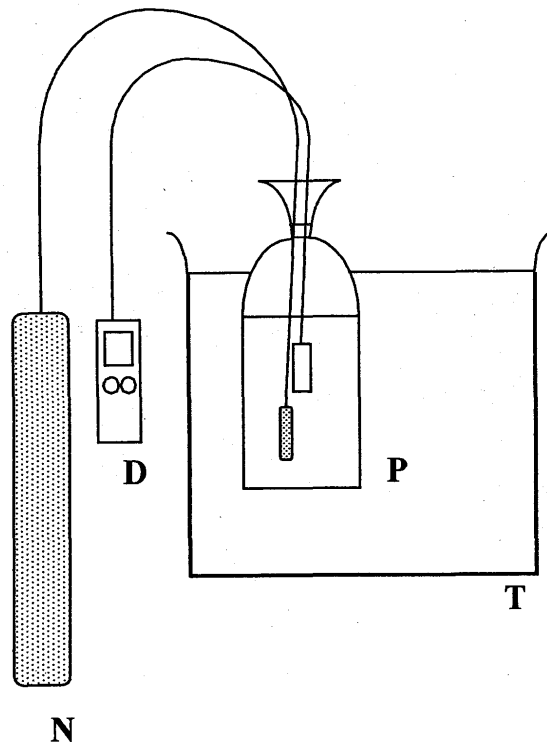


Fig. IV-2-1. Apparatus for the low oxygen treatment. N, nitrogen gas cylinder; D, dissolved oxygen analyzer; T, 500 L tank; P, plastic bag used for low oxygen treatment.

処理 DO が 10% で 240 分間処理を行った試験区のみを飼育した（正常な発生が行われれば、240 分で約 6 つの体節が形成される）。また、対照区として DO が 100% で 240 分処理した卵を飼育した。飼育は現行の種苗生産で用いられている方法に準じて行い、飼育餌料はワムシ（*Brachionus rotundiformis*）を孵化後 4-21 日、アルテミア幼生（*Artemia nauplii*）を孵化後 20-29 日、市販の配合飼料を 17 日から飼育終了までの間与えた。飼育期間中の水温および DO はそれぞれ 19.0-21.5°C、80% 以上となるように調節した。また、孵化後 40 日目に、ノギスを用いて稚魚の標準体長を測定して試験区と対照区で比較した。有意差検定には、Student's *t*-test を用いて危険率 1% で判定を行った。

d) 体節の観察

設定した各低酸素処理条件による孵化への影響を調べるため、すべての試験区において孵化仔魚 100 個体を採取し、目視により脊索の屈曲等の有無を区別し、正常孵化率、異常孵化率および沈下卵率を調べた。また、体節形成への影響を調べるため、すべての試験区において正常孵化した 30 尾を実体顕微鏡、生物顕微鏡および微分干渉顕微鏡を用いて観察し、体節異常の発生率を調べた。体節異常の有無の判断は、体節が等間隔で規則正しい山形を示している個体を正常とし、体節が等間隔ではない、あるいはその境界が不鮮明な個体を分節異常とした（Fig. IV-2-2）。さらに、処理時間と分節異常の発生範囲との関係を比較するため、体節異常のある個体においてのみ、その異常部位および数を調査した。そして、Spearman's rank correlation test を用いて、処理時間と異常の範囲との相関を危険率 1% で調べた。

e) 体節異常および椎体異常部位の位置的比較

飼育を行った設定区および対照区から孵化仔魚を 50 尾ずつサンプリングし、生物顕微鏡およ

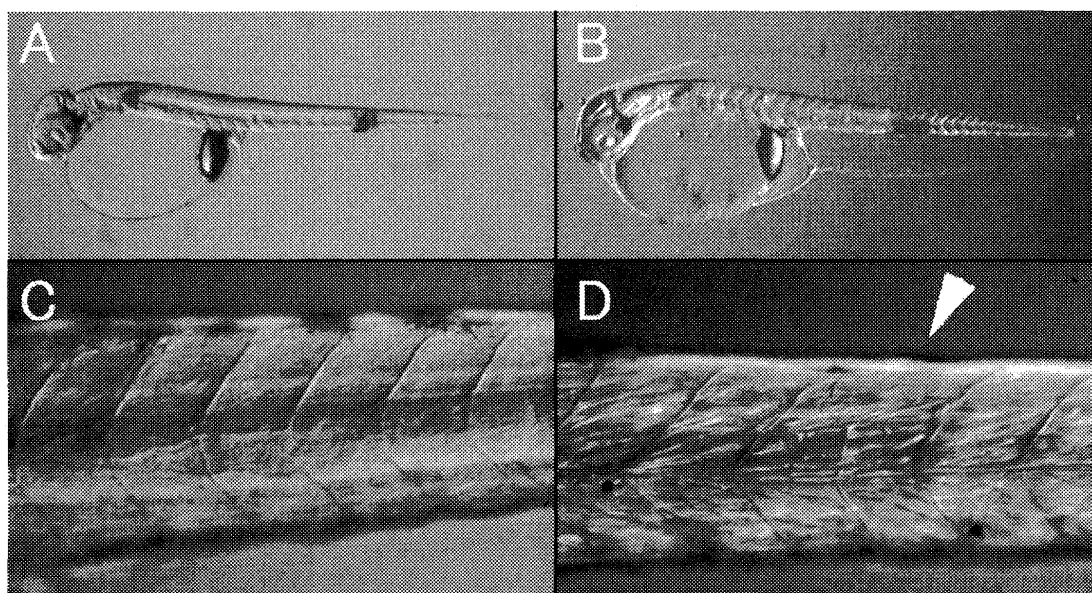


Fig. IV-2-2. Examples of somitic disturbances in red sea bream newly hatched larvae. A and C: normal, B and D: abnormal. C and D were higher magnification of A and B of somites respectively. Allow head shows somitic disturbances in the abnormal specimen. Bars in A and B indicate 500 μ m; C and D indicate 30 μ m respectively.

び微分干渉顕微鏡を用いて体節異常の発生率および発生部位を調査した。また、40日令の知行を50尾ずつサンプリングし、10%無調整ホルマリンで固定した後、軟X線撮影を行い、得られた軟X線画像より椎体異常の発生率をよび発生部位を調査した。体節異常と椎体欠損の位置の比較には、Pearson's correlation coefficient testを危険率1%で行い、統計学的に検討した。

f) 椎体欠損誘導の確認

誘導された椎体異常が椎体欠損であることを確認するため、典型的な脊椎骨異常のある個体10個体と正常個体10個体について、川村・細谷⁴⁹⁾の方法に準じて軟骨・硬骨二重染色法で染色した透明骨格標本作製し、外部形状の比較を行った。また、脊椎骨異常のある個体10尾と正常個体10尾について、クリオスタット (CM 1850, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) を用いて凍結硬組織切片を作製し、光学顕微鏡にて内部構造を観察し比較した。

IV-2-2. 結 果

a) 供試卵の卵質

合計7日間の産卵によって得られた受精卵のうち、未処理 (0分) の卵の孵化率はどの日も99%以上であり、7日間に供した卵の卵質は産卵日による差が見られなかった (Table IV-2-1)。また、すべての試験区において、低酸素処理後の孵化率は95%以上を示し、低酸素処理が孵化率に大きく影響しないことが示された。しかし、本研究での孵化率の算出には、正常孵化のみでなく異常孵化も含まれる。また、胚体が形成されなかった卵は、本研究には用いなかった。したがって、本研究における孵化率は、胚体形成以降の卵の孵化率 (正常な孵化個体も異常な孵化個体も含む) を示している。

b) 飼育結果

飼育水温は19.0-24.1℃の範囲にあった (Fig. IV-2-3)。孵化後11日から19日間の6日間は、

Table IV-2-1. The hatching rate of the eggs treated with various dissolved oxygen concentration and expose times

Exposed time (min)	survey range	Dissolved oxygen concentration (%)					
		0	10	25	50	75	100
		0.5-1.7	8.8-13.5	23.3-27.0	48.0-52.7	71.7-75.9	99.6-101.3
0		99.1 (99.6)* ¹	100.0 (99.1)	99.5 (97.2)	100.0 (99.2)	99.2 (98.4)	100.0 (99.1)
5		100.0 (96.7)	100.0 (99.1)	100.0 (98.2)	100.0 (100.0)	99.7 (98.1)	100.0 (98.2)
10		99.0 (89.8)	100.0 (97.8)	98.4 (95.5)	99.9 (98.4)	100.0 (99.6)	100.0 (99.1)
30		100.0 (95.0)	100.0 (98.7)	97.9 (99.6)	100.0 (98.8)	100.0 (99.5)	100.0 (99.6)
60		99.8 (97.9)	100.0 (99.2)	98.9 (98.7)	100.0 (99.2)	99.7 (98.8)	100.0 (99.6)
120		100.0 (0.0)	99.6 (0.0)	97.9 (98.2)	99.6 (100.0)	99.8 (98.3)	100.0 (99.6)
240		99.6 (0.0)	99.2 (0.0)	97.6 (98.6)	99.6 (99.6)	100.0 (98.7)	100.0 (099.2)
360		97.5 (0.0)	99.2 (0.0)	99.3 (98.6)	98.9 (99.6)	99.1 (100.0)	99.5 (100.0)

*¹Normal hatching rates in relation to hatching rates.

病名不明の病気が発生したため、すべての試験区にオキシテトラサイクリン（OTC 散 20%，セラケム株式会社）を、有効 2 および 3 ppm で投薬し、水温を 24℃まで上昇させた。これ以外の日令では、飼育期間を通して 21.5℃でほぼ一定に保った。また、DO は 86.0-121.4%の範囲にあり、すべての水槽において 80%以上を維持した。

孵化後 40 日における稚魚の標準体長は試験区（処理 DO 10%，処理時間 240 分）および対照区（処理 DO 100%，処理時間 240 分）において、それぞれ 26.7 ± 1.2 (mean \pm SD, $n=100$) および 27.9 ± 1.4 mm であり、試験区の標準体長は対照区に比べて有意に小さかった ($p < 0.01$)。

試験区および対照区の生残率は、平均でそれぞれ 27.7%および 47.3%であり、試験区が対照よりも低かった。この理由として、試験区では病気で死亡する以外に、低酸素処理により異常孵化した個体が成長するにつれて死亡する個体が見られたためである。

c) 体節分節異常の頻度

25%以上の DO で処理した区では、処理時間に関わらず体節分節異常は生じなかったが、0 および 10%の DO で処理した区では体節異常が生じた。処理 DO が 0%の場合は、処理時間 10 分から 60 分では分節異常が数%発生し、120 分以上の処理時間では分節異常は急激に増加し 100%の発生率となった。処理 DO が 10%の場合は、処理時間 10 分から 60 分までは体節異常は発生せず、120 分以上で 100%発生した (Fig. IV-2-4)。この結果から、処理 DO および処理時間によって体節分節異常の発生状況は異なり、処理 DO が 10%以下で体節分節異常が発生し、より低い DO であるほど短時間の処理で体節分節異常が発生することが明らかとなった。

DO が 0%，360 分のような強度処理条件においては、孵化仔魚に脊索が屈曲している個体が多く観察され、屈曲部位では体節異常が見られた (Fig. IV-2-5)。また、分節異常の数は、処理時間 120, 240, 360 分において、平均でそれぞれでは、1.1, 5.6, 10.1 箇所であり、処理時間と異常の数に有意な相関がみられた ($p < 0.01$)。そして、処理時間が長くなると異常の数も増

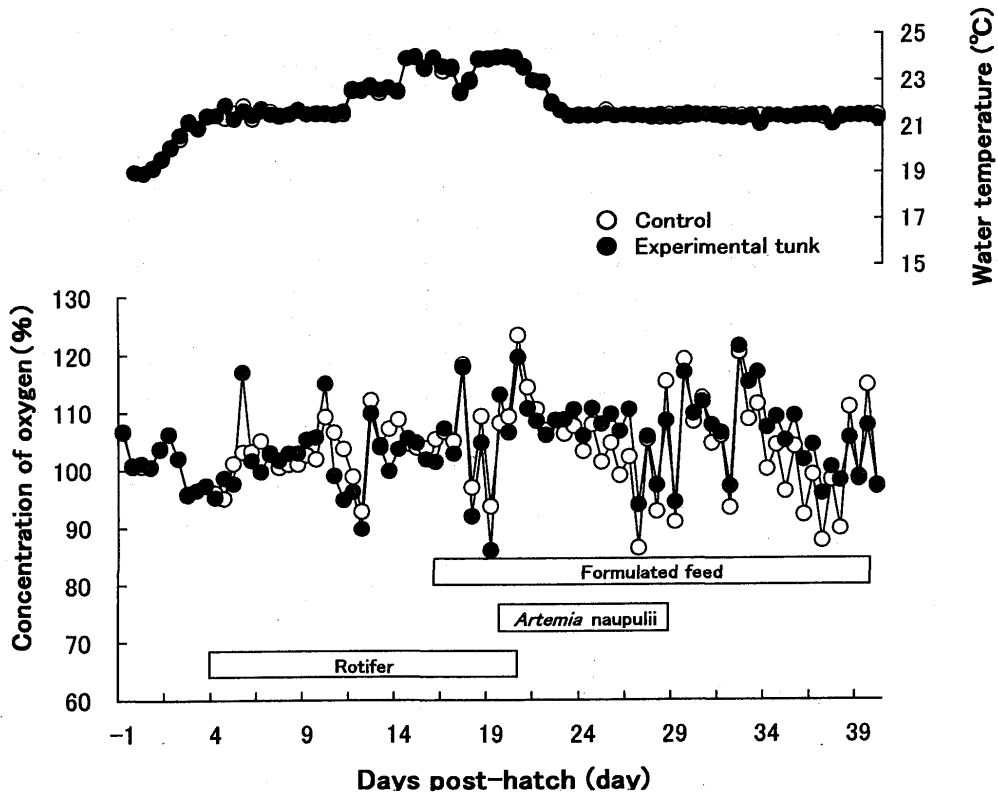


Fig. IV-2-3. Rearing of red sea bream larvae and juveniles which were exposed to the low dissolved oxygen concentration during embryonic development.

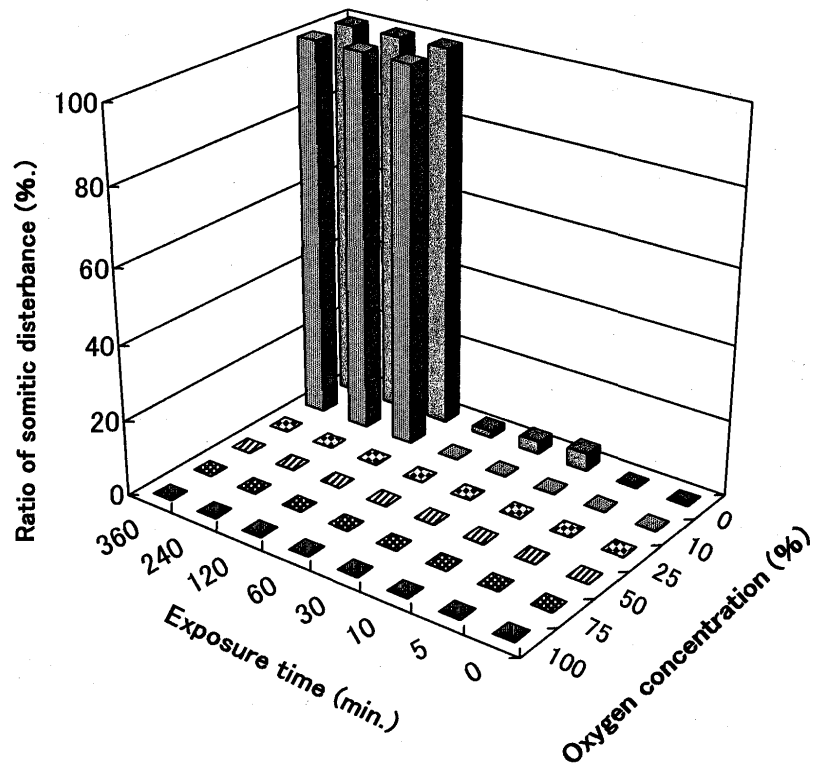


Fig. IV-2-4. Relationship between ratio of somitic disturbance and exposure time in each oxygen concentration. The incidence of somitic disturbance indicated 100% was percentage in total hatching rate. Thirty specimens were used in each test established by oxygen concentration and treatment time.

加することが明らかとなった (Fig. IV-2-6)。

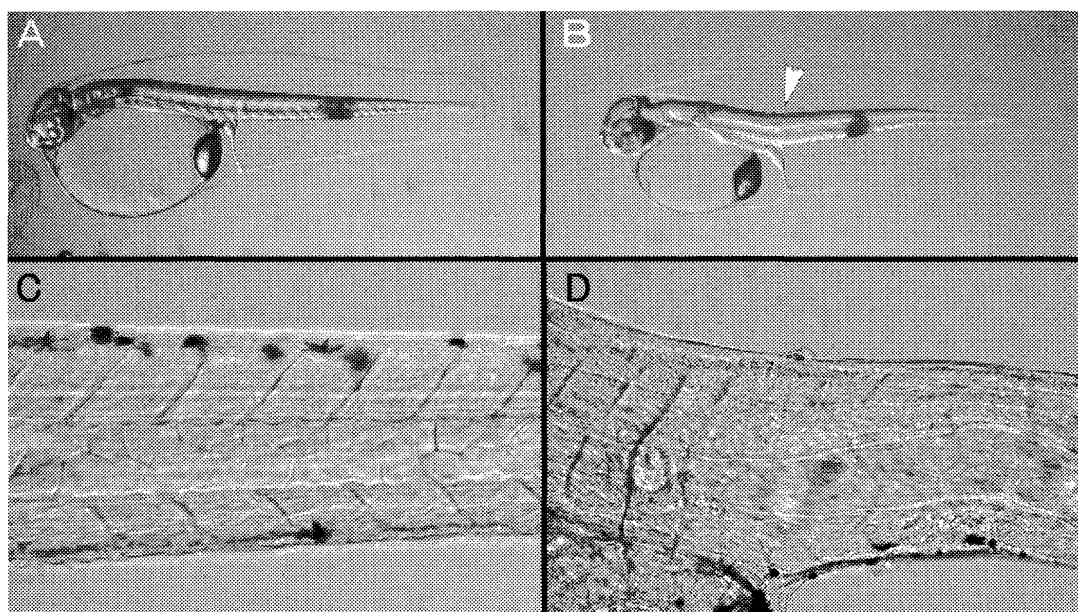


Fig. IV-2-5. Examples of somitic disturbances in red sea bream newly hatched larvae. A and C: normal, B and D: abnormal treated with extreme low oxygen concentration. C and D were higher magnification of A and B of somites respectively. Arrow head shows somitic disturbances in inflection of notochord in the abnormal specimen. Bars in A and B indicate $500\ \mu\text{m}$; C and D indicate $30\ \mu\text{m}$ respectively.

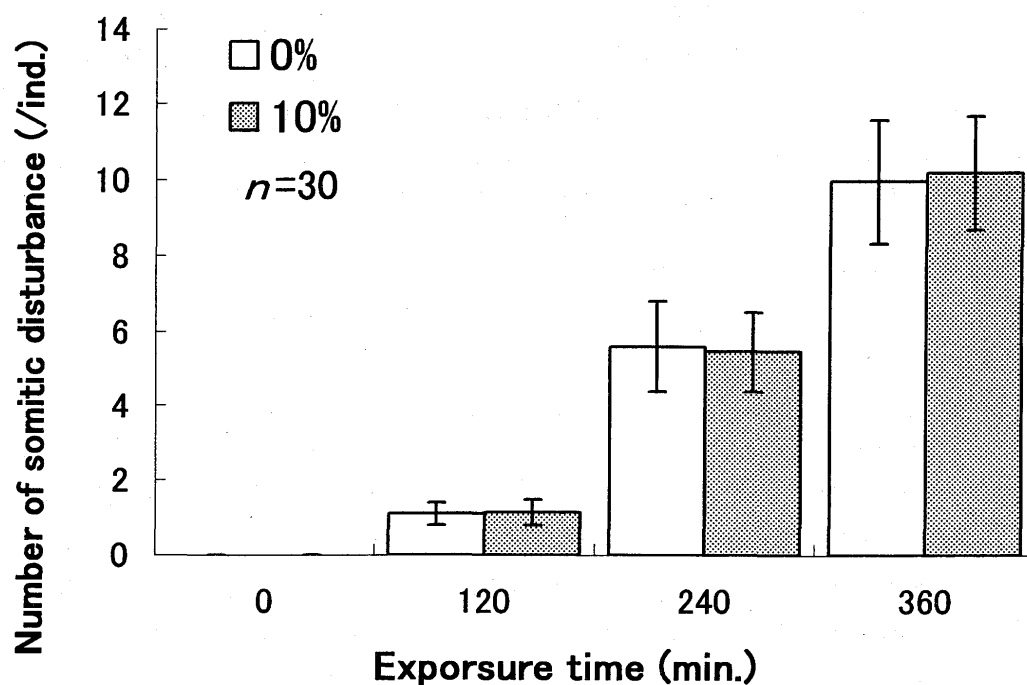


Fig. IV-2-6. Number of somitic disturbance in larvae exposed to zero and ten percent oxygen concentration water.

d) 体節分節異常と椎体欠損の位置的比較

仔魚にみられた体節分節異常は、第9から22体節で観察された。特に第12から17体節では

50%以上の個体での体節分節異常が観察され、第15体節ではその発生が最も多く96%であった。また、稚魚にみられた椎体欠損は、第2から23椎体で観察された。特に、第11から18椎体では50%以上の個体で椎体欠損が観察された。第14椎体ではその発生は最も多く87%であった。孵化仔魚にみられた体節分節異常および稚魚にみられた椎体欠損において、発生範囲および最頻値は多少異なるものの、発生部位について有意な相関 ($p<0.01$) がみられた (Fig. IV-2-7)。

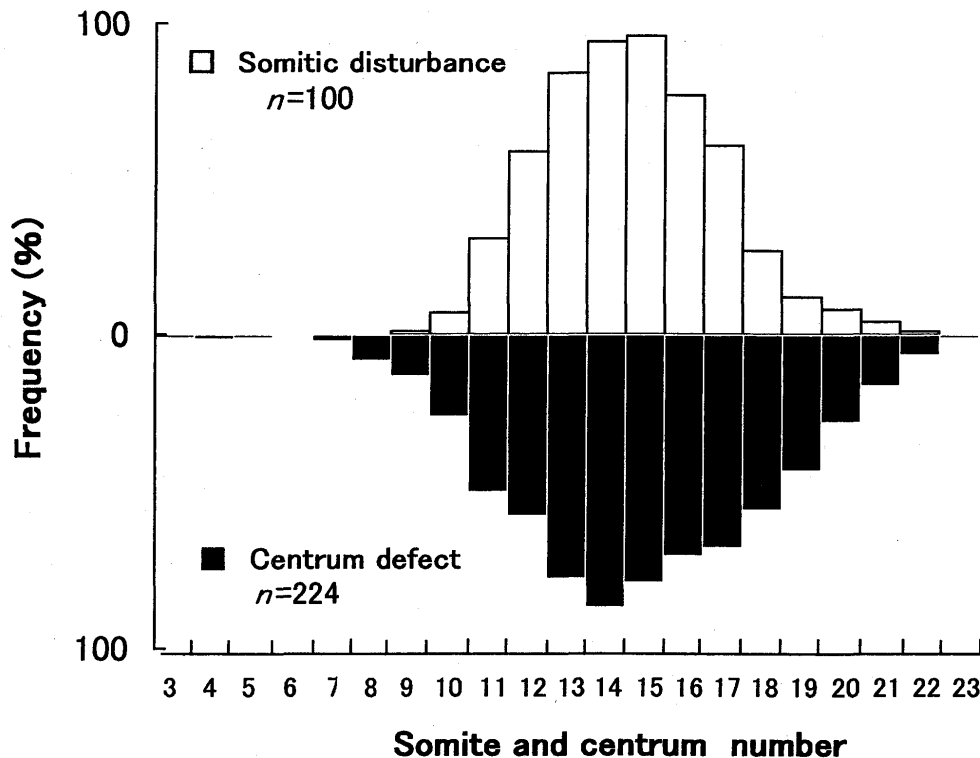


Fig. IV-2-7. Frequency distribution of somitic disturbances and centrum defects in the low oxygen treated red sea bream larvae and juveniles from 3rd to 23rd somite.

e) 椎体欠損誘導の確認

軟X線画像による診断では、飼育した稚魚の試験区および対照区における椎体欠損の発生率はそれぞれ、99.1と3.4%であった。

試験区で多く発生した短軀症個体について透明骨格標本作成して観察した結果、異常な椎体には1つの椎体に複数の神経棘および血管棘を有するという特徴が見られ (Fig. IV-2-8-E)、仔魚にみられた体節分節異常は、第9から22体節で観察された。特に第12から17体節では50%以上の個体での体節分節異常が観察され、第15体節ではその発生が最も多く96%であった。また、稚魚にみられた椎体欠損は、第2椎体23椎体で観察された。特に第11から18椎体では50%異常の個体で椎体欠損は異常な椎体数の増加に伴い、椎体の総数が減少していた。また、硬組織切片を作成して本研究で発症した異常椎体の内部構造を観察した結果、異常椎体の内部構造において、1つの椎体に複数の神経棘および血管棘が付随しているにも関わらず、正常な椎体と隣り合う椎体の間にみられる骨組織の不連続面が見られず、靱帯も1つしか持たないという特徴を持っていた (Fig. IV-2-8-F)。これらの結果より、本研究で発生した脊椎骨異常が椎体欠損でありことが明らかとなった。

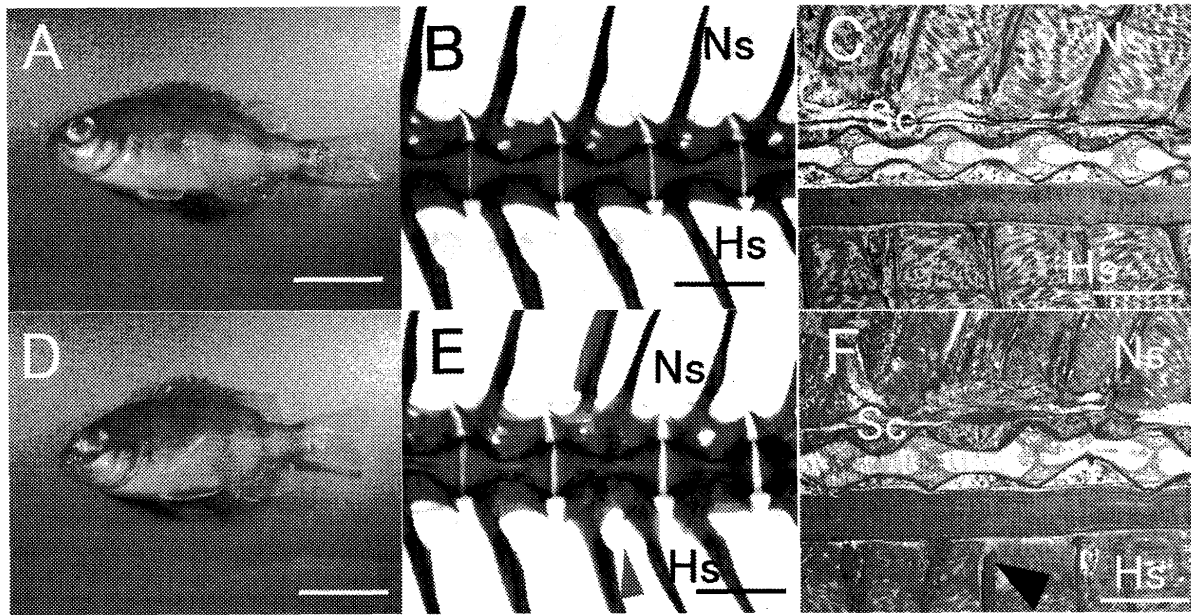


Fig. IV-2-8. Example of external appearance and vertebrae in red sea bream larvae. A, B, and C: normal specimen, D, E, and F: abnormal specimen treated with extreme low oxygen concentration. B and E: transparent skeletal specimen, C and F: sagittal section. Ns: neural spine, Hs: hemal spine, Sc: spinal cord. Allowhead and square show centrum defect in the abnormal specimen. Bars in A and D indicate 1 cm; those in B, C, E and F indicate 1 mm, respectively.

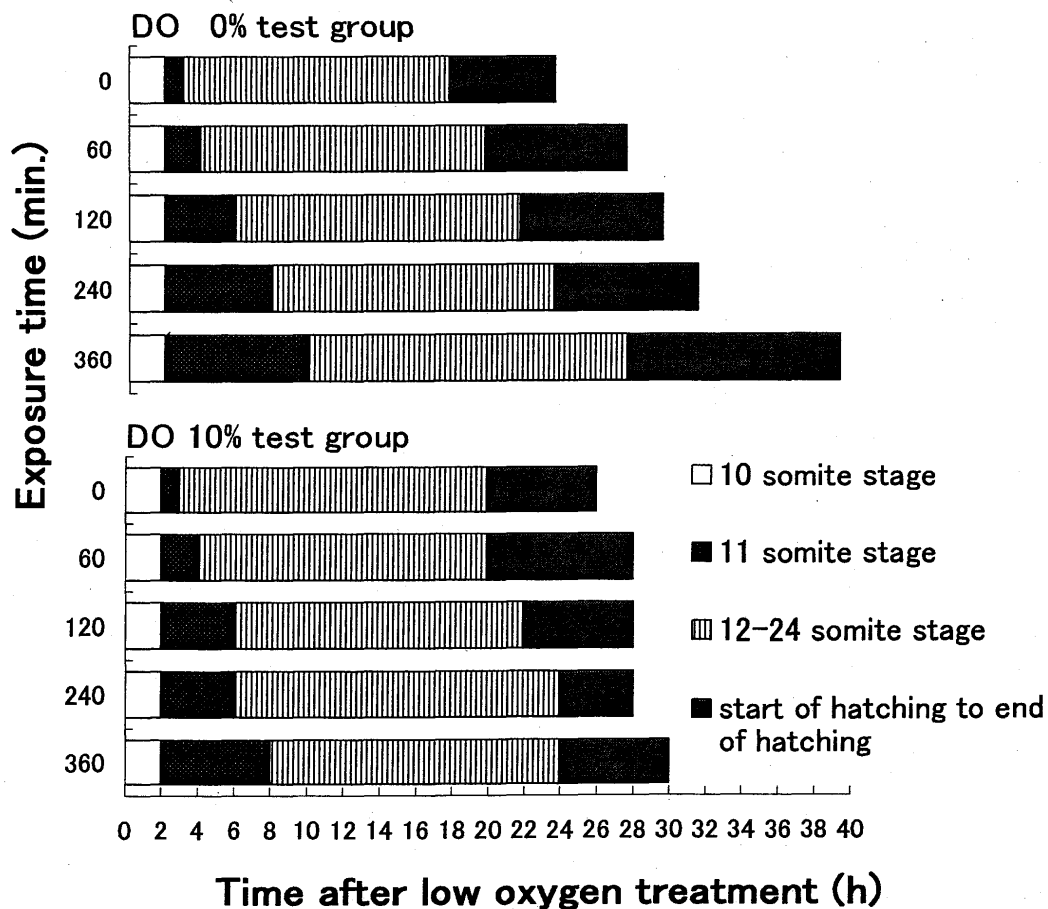


Fig. IV-2-9. Delay of hatching caused by low dissolved oxygen treatment.

e) 孵化の遅延

孵化仔魚の体節に異常が見られた DO 0%および 10%処理区においては、未処理区の孵化仔魚と比較すると孵化の遅延が見られ、処理時間が長いほど孵化までに要する時間が長く、特に DO 0%処理区では、処理時間 60, 120, 240, 360 分においてそれぞれ、2, 4, 6, 10 時間の遅延が見られた (Fig. IV-2-9)。また、低酸素処理前の 10 体節形成時から孵化までの胚発生過程を観察すると、DO 0 および 10%処理区においては、低酸素処理を行っている間は、処理時間開始時と同じ 10 体節前後で体節の分節形成が定位ししていた。しかしながら、低酸素処理を行った後、DO 約 100%で培養すると、体節の異常は発生したものの、再び分節形成が始まり孵化に至った。

Ⅲ-2-3. 考 察

a) 実生産への応用

第Ⅲ章 1 節の研究により、体節形成期の酸素不足がマダイ椎体欠損を誘導することが明らかとなり、本研究ではこの知見を実生産に応用するため、溶存酸素濃度および接触時間と椎体欠損の発生について検討した。その結果、体節異常は 0%では 10 分以上の処理で、10%では 120 分以上の処理時間で発生することが明らかとなった。

実際の生産現場において、椎体欠損による短軀症の発生率は 5%前後であり、そのほとんどが、1~2 個の椎体欠損である⁸⁾。また、これまでの研究から、浮上卵による密集層が形成されたときの層内部の DO は 5~10 分間ではほぼ 0%に達することが判明している (Fig. IV-1-4 および IV-1-5 参照)。また、本研究では DO 10 分間の低酸素処理において数%の分節異常が発生した。これらの結果を考慮し、実生産において椎体欠損の原因が低酸素であるとする以下が推測される。受精卵の浮上卵と沈下卵の分離や輸送の際、受精卵は密集層を形成する。その密集層における溶存酸素濃度は 5~10 分間で急激に低下する。この低酸素濃度の状態が 10 分以上維持され椎体欠損が発生する。したがって、種苗生産において、以下のことについて提案することができる。

卵輸送においては、卵が層状にならないようにエアレーション等で攪拌し、浮上卵による密集層をつくらないこと。また、浮上卵と沈下卵の分離においては、分離時間を短くし、体節形成期での分離は極力避けること。仮に体節形成期に分離作業が必要な場合であっても、大きな容器で分離を行い、浮上卵による密集層をつくらないこと。

このような防止策を講ずることにより、効果的に椎体欠損による短軀症の発生を減らすことができ、生産効率の向上につながるものと考えられる。また、Alderdice らは低酸素がシロサケの卵にもたらす影響を報告しており⁹⁾、その報告によると、卵期の低酸素により奇形が発生し、脊椎骨後方の短縮が見られ、体節形成が阻害されたと記されている。また、孵化の遅延が観察されたとも報告されており、本研究で見られた異常と類似する点はある。他魚種において、卵期の DO の影響を調べた研究はほとんどないが、この報告から、本研究結果は他魚種において適用可能な知見である可能性は高い。

b) 体節異常数と低酸素処理条件

体節異常の発生率は、処理時間 120 分以上から急激に増加し、0 および 10%の DO において 100%発生した。本研究におけるマダイ卵の培養および処理水温は 19.0℃で一定していた。一定の水温で培養した場合においても、胚発生期における 1 つの体節を形成するのに要する時間は体節の位置によって異なり、本研究に用いた卵の 10 体節形成時における 1 体節の形成に要した発

生速度は約 40 分であった。したがって、処理時間 60 分で体節異常が高率に発生することが予測されたが、その発生率はわずか 1.7%であった。観察した仔魚の分節異常の位置が黒色素胞の位置と一致し、異常を確認できなかった可能性も考えられるが、この原因については不明である。

c) 体節異常部位

本研究では、およそ 10 体節が形成された段階で低酸素処理を行ったが、異常部位は体節、椎体ともに、第 10 体節あるいは第 10 椎体よりやや後方で発生した。

脊椎動物において、体節は脊索に近い中胚葉（傍軸中胚葉）がひとかたまりの細胞塊としてくびきれることで形成される。この過程を分節とよび、その分節性をもたらすものは、体節前部と後部の細胞の性質の違い（前後極性）である⁹⁴⁾。マウスおよびゼブラフィッシュにおいて、体節の前後極性の形成に重要な機能をもつ *Mesp2* および *mespb* は、今まさに形成されつつある体節より 2 体節後方の未分節中胚葉でのみ発現することが報告されている^{77, 78, 94)}。マダイにおいて *Mesp2* または *mespb* と同様の働きをする遺伝子が存在すると仮定すると、10 体節ではなく、2 つ後ろである 13 番目の体節付近で異常が多く見られた現象について次のような仮説が立てられる。本実験は 10 体節が形成された段階で低酸素処理を行ったが、視覚的に 10 体節が形成された段階では、11 および 12 体節に位置する未分節中胚葉はすでに前後極性を形成し、体節への分化を終えていることが考えられる。したがって、視覚的に体節形成が行われている段階での低酸素処理が体節異常につながるのではなく、*Mesp2* または *mespb* に相当する遺伝子が発現し、これらによって体節の前後極性の形成が行われている段階での低酸素処理が原因で体節分節異常につながり、結果的に、その異常の位置は処理開始時よりも後方の体節にみられたと考えられる。そして、体節異常の位置と椎体欠損の位置とが一致することから、椎体欠損も開始時より後方で発生したと考えられる。

d) 体節異常の分子機構

脊椎動物において、体節は脊索に近い中胚葉（傍軸中胚葉）が一塊の細胞塊としてくびきれることで形成される。この過程を分節とよび、その分節性をもたらすものは、体節前部と後部の細胞の性質の違い（前後極性）である。この体節の前後極性の形成においては、傍軸中胚葉の自律的な時間的および空間的両方の制御が必要である。体節形成の空間的制御においては、前後極性が形成されたからといって、分化が自立的に起こるわけではない。実際に、体節が分節するためには、外胚葉からの何らかのシグナルが必要であると現在のところ考えられている^{94, 95)}。また、体節形成の空間的制御においては、体節形成に伴う変動性の遺伝子初権をさらに制御する分子時計が存在することが明らかにされている^{95, 96)}。

近年、分子時計を構成する遺伝子が発見されており、体節形成に伴う変動性の遺伝子発現の制御には、*Notch* シグナリングが深く関与していることが明らかとなっている。マウスでは、*Notch* シグナル伝達のリガンドである *Mesp2* が *Notch* シグナル系を制御して体節の前後極性の決定に重要な働き（後方化の抑制）をすると考えられている^{94, 95)}。ゼブラフィッシュでは *Mesp2* と同様の働きをする *Mespb* が発見されている⁹⁵⁾。これらのことから、本研究で誘導された体節の分節異常の分子機構について、仮説を立てると次のようになる。本研究では低酸素処理中には発生の停止が見られた。ある一定以上の低酸素状態になると、上皮外胚葉からの未分化中胚葉へのシグナルが停止あるいは阻害されてしまうため、分節化は起こらず発生が一時的に止まっているように見える（体節形成の空間的制御は停止あるいは阻害される）。一方、未分化中胚葉は自律的に

発生するため、前後極性の獲得のためのシグナル伝達が行われている(時間的制御は進行する)。しかしながら、低酸素の影響を受けているため後方化因子である *Dll1* を制御する *Mesp2* (*mespb*) が作用することができないため、時間的制御の進行が阻害されて、体節がすべて後方化してしまい、前後極性が失われ、本来形成されるべき体節が喪失してしまうのではないかとと思われる。

f) 今後の研究

本研究では、低酸素により椎体欠損を誘導したが、他の要因により椎体欠損が発生する可能性は十分に考えられ、溶存酸素の他に、水温や塩分濃度、アンモニア濃度といった環境的要因が挙げられる。シロサケおよびメダカでは発生初期の高水温の培養により双体奇形が出現するという報告があり^{67, 93, 97)}、ゼブラフィッシュでは、体節形成期の熱ショックにより体節異常が見られたという報告がある⁹⁸⁾。いずれの報告も、卵期の熱ショックによる異常発症例である。メダカにおいては、脊椎骨の癒合は発生過程のある限られた時期に起こりやすいという報告があり⁹⁹⁾、マダイでは体節形成期でのみ低酸素によって体節に異常が誘導されるという結果と類似する。しかしながら、ゼブラフィッシュの研究と同様に、マダイ卵に熱ショックを与えて培養したところ、体節に異常は見られなかった(未発表)。つまり、淡水魚と海水魚、もしくは魚種間によって性質や耐性が異なることが考えられるため、必ずしもシロサケ、メダカおよびゼブラフィッシュにおける異常の知見を、マダイにそのまま当てはめることはできない。しかしながら、本研究において対照区に椎体欠損が発生していたことは、低酸素以外の原因による発生であり、椎体欠損の発生を完全に防止するためには、上記の環境要因などについて検討する必要がある。

また、本研究では、椎体欠損の発生防止を生産レベルで応用できる結果が得られたが、その発生のメカニズムまでは特定するに至っていない。本研究では、先の研究結果と同様に、体節分節異常と椎体欠損の発生部位に相関がみられたことから、仔魚の体節異常発生率が椎体欠損発生率に相当すると考えてほぼ間違いはないだろう。しかしながら、条件設定したすべての試験区を飼育していないため、椎体欠損の真の発生率は不明であり、現段階では仔魚の体節分節異常の結果による推察にすぎない。さらに、処理時間 120 分から体節分節異常が急激に増加した事についても不明である。したがって、椎体欠損の発生のメカニズムを明確にするためには、分子生物学的および遺伝学的手法を用いて、体節分節異常から椎体欠損への異常発生機構を分子レベルで明らかにする必要がある。

要 約

マダイ *Pagrus major* は養殖対象魚種の中でも最も生産技術が進んでいる魚種であるが、現在の生産技術においても少なからず形態異常が発生し、生産効率だけでなく販売価格の低下を招いている。形態異常の問題を解決することは、養殖経営における生産効率の向上に貢献するだけでなく、形態異常の防除は安全な食品として養殖魚を消費者に提供するという養殖産業界の姿勢において重要である。さらには、我が国で広く行われている種苗放流による天然資源増強の効果を上げることにおいても形態異常の防除は重要な課題である。

このような背景から、本研究では、マダイの優良種苗生産のための技術開発に資する目的で、養殖用種苗に発生する形態異常、特に短軀症について、その症状の詳細な把握、発生の原因解明といった基礎的知見と、その発生の防止に向けて生産現場において直接利用できる応用的知見を得ようとした。

本研究において得られた結果は次の通りである。

第Ⅰ章 1 節では、産業規模でのマダイ種苗生産において、どのような異常がどの程度発生しているのか把握することを目的として、選別調査より形態異常の種類およびその発生率について調査した。2 節では、マダイの生産現場で発生する主な形態異常の透明骨格標本作製し、その骨格異常を形態学的に検討した。

I-1-1: マダイ種苗生産における短軀症の発生率は 3.54 から 7.25% の範囲で、いずれの生産年度においても短軀症はすべての形態異常のなかで最も高率かつ恒常的に発生していた。

I-2-1: 頭部の形態異常、背鰭担鰭骨の異常、吻部のねじれ、パグヘッドネス、脊椎側弯症、前弯症などの短軀症以外の形態異常については、ほぼ 1 % 以下と低率であった。

第Ⅱ章では、マダイ種苗において最も高率に発生する短軀症について、原因解明のファーストステップとして、その症状を詳しく解析した。

Ⅱ-1: 短軀症の外部形態の特徴として、正常個体に比べ軀間部が短いだけでなく、体高も有意に高いことがあげられる。

Ⅱ-2: 短軀症に最も多くみられた脊椎骨の異常は、形態学的、組織学的検討の結果、脊椎癒合ではなく椎体欠損である。また、次いで多くみられた症状は短縮椎体であり、正常椎体に比べ椎体長と椎体径が約 10% 程度短縮していた。これら 2 つの症状は短軀症の約 90% を占めた。

Ⅱ-3: 短軀症は異なる系統の親魚を用いても毎年恒常的に発生する。また、短軀症個体の咽頭骨組織や血液性状は正常個体と比べて有意な差が得られなかったことから、生産現場で発生する短軀症の原因は、遺伝的および栄養学的なものではなく、飼育環境的要因により発生すると考えられた。

第Ⅲ章では、椎体欠損症の原因として、環境要因である低酸素の影響や高水温の影響について検討した。

Ⅲ-1-1: マダイの胚発生期において、溶存酸素濃度 10.3~16.6%で6時間処理を行い、体節形成期のみで椎体欠損が発生し、低酸素が椎体欠損の原因の1つであることが明らかとなった。

Ⅲ-1-2: 胚発生期に低酸素で処理した個体の孵化仔魚で観察された体節分節異常の発生部位と、稚魚で観察された椎体欠損の発生部位には、有意な位置的相関が見られた。この結果より、体節分節異常は椎体欠損の前駆症状であることが示唆された。このことは、仔魚期の段階で椎体欠損を予測することができ、生産現場において椎体欠損発症の早期発見につながると考えられた。

Ⅲ-2-1: マダイ胚発生期の10体節形成期前後に培養水温より2~10℃および5~30℃の高い高水温での処理を、1~300秒の短時間および5~180分間行った。しかしながら、孵化仔魚には体節分節異常は発生せず、高水温ショックは椎体欠損の原因ではないものと考えられた。

第Ⅳ章では、実際の生産現場での環境を考慮して、第1節ではマダイ卵の酸素消費量を測定し、卵が密集した場合についての酸素消費を検討した。第2節では様々な濃度と時間によって低酸素処理を行い、椎体欠損の発生率を見積もった。

Ⅳ-1-1: マダイ体節形成期の単位時間当たりの酸素消費量は、それぞれ、3.67, 4.67, および 6.67 $\mu\text{l}/\text{ind}/\text{min}$ であり、水温の上昇とともに増加した。桑実胚から孵化までの卵1粒あたりの総酸素消費量を算出すると、16℃, 19℃, および 22℃では、それぞれ 1.35, 1.20, および 1.09 μl であり、水温の上昇とともに総酸素消費量は減少した。

Ⅳ-1-2: マダイ受精卵が水面で密集した場合、密集する卵数によって変化はあるものの、密集層における間隙水の溶存酸素濃度は約10分で0%になると予測された。

Ⅳ-2-1: マダイ体節形成期に、溶存酸素濃度 10 および 0%で120分間低酸素処理を行った場合、ほぼ100%で体節異常が発生した。また、溶存酸素濃度が0%の場合10分以上の処理時間で体節異常が発生し、短時間で椎体欠損が発生することが予測された。

Ⅳ-2-2: 溶存酸素濃度が0%の場合、その処理時間によって体節形成が停止し、孵化の遅延が生じた。

種苗生産の過程で、胚発生期に急激に低酸素状態になることは、浮上卵と沈下卵の分離作業時だけでなく、卵輸送時でも輸送容器内での海水の攪拌が行われない場合は十分に起こりえる得る現象である。本研究の結果からも、非常に短時間で低酸素の状態になり、椎体欠損を引き起こす可能性が推察される。したがってこのような過程では、溶存酸素濃度の管理に十分注意を払うとともに、既存の採卵方法や輸送方法を改善する必要があると思われる。

本研究では、椎体欠損による短軀症についての原因とその防止策について検討した。しかし、その発症のメカニズムについては解明できていない。したがって、今後は分子生物学的・生理学

的手法などを用いて発症のメカニズムを明らかにする必要がある。また、椎体欠損の原因は胚発生期における酸素不足のみではないことも考えられる。したがって、今後培養水中のアンモニア濃度や抗生物質投与の影響など、その他の要因についても検討する必要がある。

椎体の欠損はマダイに限らず、ブリ、ヒラメ、シマアジなど多くの養殖対象魚種で発生し、本研究で得られた知見は、マダイだけでなく他の養殖対象魚種に応用することができる成果である。しかしながら、形態異常には数多くの症状があり、本研究によってもそのほんの一部が解決されたにすぎない。今後は、各魚種において本研究で行ったように選別調査、症状の詳しい解析、飼育実験を通じて、形態異常の原因を明確にし、その防止策を検討しなければならない。そうすることにより、効率的な生産かつ安全な養殖魚の生産に結びつくものと考えられる。

Summary

Morphological deformities often occur in cultured red sea bream *Pagrus major*, although its production technology is the most advanced one among the species for aquaculture. Their occurrence brings not only the decrease of production efficiency but also the decrease of its market value. Therefore, the development of technique for prevention of morphological deformities is urgent for aquaculture management. Prevention of deformities also contributes to improve consumer's impression about aquaculture products, because they hope for the safety food. Furthermore, it is an important problem to achieve increased effectiveness in reinforcement of natural resources by releasing artificially hatched seedlings which is extensively conducted in Japan.

The author intended to obtain basic knowledge such as the correct understanding of the symptom and investigated the cause of morphological deformities, especially for shortened body condition of red sea bream. The author also intended to obtain practical information such as the prevention method of it for the contribution to the development of production technology of high quality red sea bream seedlings.

The results obtained in this research are as follows:

In the 1st chapter, to gain an understanding of the actual situation, type of morphological deformities and their incidence were investigated in the triage process of practical seedling production.

1. Shortened body condition had the highest incidence of all deformities and regularly occurred from 3.54 to 7.25% in the practically produced seedlings.
2. Other deformities such as the deformity in head, dorsal pterygiophores, jaw, pugheadness, scoliosis and lordosis occurred at low rates (less than 1.0%).

In the 2nd chapter, the highest deformity, shortened body condition, was analyzed the symptom in detail from morphological and histological standpoint as the first step investigation of its causality.

1. External appearance of abnormal seedlings had not only the shorter trunk length but the higher body height than normal one.

2. The vertebral deformity most frequently observed in abnormal seedlings was centrum defects. The second-highest symptom was the undersized centrum. These two symptoms accounted for approximately 90% of the vertebral deformities in individuals with shortened body condition.
3. The symptom of centrum defects was plural pair of haemal and neural spines existing in single centrum, although the internal structure of such abnormal centrum was diagnosed one centrum. The more condition of this symptom was serious, the more the total number of centrum was reduced. However, total number of neural and haemal spines was not reduced in individuals with centrum defects. For these results, we diagnosed that the symptom was not fusion but centrum defects.
4. The symptom of undersized centrams was that the length and vertical diameter of centrum were approximately 10% shorter than normal ones.

In the 3rd chapter, to elucidate the cause for shortened body condition with centrum defects, the effect of oxygen deficiency on the occurrence of centrum defects was investigated for red sea bream.

1. Oxygen deficiency (dissolved oxygen concentration of 10.3 to 16.6%) during somitogenesis for six hours induced centrum defects. It was elucidated that low dissolved oxygen concentration during somitogenesis is one of the causes of centrum defects.
2. A significant correlation was found between the location of somitic disturbances in newly hatched larvae and that of centrum defects in juveniles. It suggested that somitic disturbance in larvae is the premonitory symptom of centrum defects. This result will make the early diagnosis of centrum defects possible in the larval stage in practical seedling production.

In the 4th chapter, to apply the results obtained to the practical production, the incidence of centrum defects was estimated by exposing various oxygen concentrations for various periods.

1. Somitic disturbance was induced by exposing to low oxygen concentration (0% and 10%) for 120 minutes during somitogenesis. In case of 0% oxygen concentration, somitic disturbance was induced by treatment for only 10 minutes. Results of this study suggested that centrum defects can be induced by the low oxygen condition for a short time.

In practical seedling production, decrease of oxygen concentration to an extremely low level is possible phenomenon during egg collection, transportation, and incubation. The result of this study suggests that dissolved oxygen concentration becomes low in a very short time during such processes, and such a condition induces centrum defects in seedlings. Therefore, dissolved oxygen concentration in the rearing water should be carefully regulated for fertilized eggs, especially during somitogenesis, for the prevention of centrum defects.

In this research, information on the causality of centrum defects was obtained, however the mechanism of the occurrence of centrum defects has not yet been elucidated. Therefore, it is necessary to clarify its mechanism by the molecular and physiological researches. In addition, the

possible causes of centrum defects except for the low oxygen concentration should be examined in the future research. As centrum defects occur in many kind of cultured fish such as yellow tail, flounder, and sea bass, the results of this study is applicable to other cultured fish. In addition, also for many kinds of morphological deformities, it is effective to prevent them by the methods adopted in this study, those are the incidence examination in the triage process in practical production, detailed analysis of symptoms, and induction experiments. Such studies will bring the effective production of safe and healthy cultured fish.

謝 辞

本研究の遂行にあたり、近畿大学水産研究所所長・教授 熊井英水博士にはマダイの養殖に関する研究に着手する機会を与えて戴き、終始貴重な御助言と御指導を賜った。また、近畿大学水産研究所助教授 澤田好史博士には、御懇切なるご指導、ご鞭撻を賜り、また御校閲戴いた。さらに本論文をまとめるにあたって、近畿大学農学部教授 細谷和海博士ならびに太田博巳博士には、終始貴重な御助言と御指導をたまわった。これらの恩師の方々に喪心より御礼申し上げます。

本研究の実施にあたり、近畿大学水産研究所教授 村田修博士、宮下盛博士、同研究所 講師 家戸敬太郎博士、同研究所助手 瀬岡学博士および研究各位には貴重なご指導と助言を戴いた。また、同研究所技術員 山本慎司氏には本研究の端緒を与えて下さり、終始貴重な助言を戴いた。ここに記して深謝いたします。

最後に、本研究は近畿大学水産研究所大島実験場で行われ、水産養殖種苗センター大島事業場の職員各位には実験魚の飼育や管理について技術的な指導をして戴いた。その間、水産増殖学研究室の卒業生諸氏には多大なご協力を戴いた。ここに感謝の意を表します。

本論文には、文部科学省 21 世紀 COE プログラムの支援を受けて行われた研究成果を含んでいる。

文 献

- 1) 村田 修 (2000) : マダイ. 最新海産魚の養殖 (熊井英水編著), 湊文社, 東京, pp. 89-108.
- 2) 北島 力 (1978) : マダイの採卵と稚魚の量産に関する研究. 長崎県水産試験場論文集, 5, 1-92.
- 3) 小畑泰弘 (1995) : 主要魚種における種苗需要動向-マダイ. 養殖, 32, 85-89.
- 4) 山口正男 (1978) : 種苗生産. タイ養殖の基礎と実際, 恒星社厚生閣, 東京, pp. 133-194.
- 5) Foscarni, R. (1988) : A review: Intensive forming produce for red sea bream (*Pagrus major*) in Japan. Aquaculture, 72, 191-246.
- 6) Kumai, H. (1995) : A review of the nursery and growout culture techniques for red sea bream (*Pagrus major*) and striped jack (*Caranx delicatissimus*) in Japan, In "Culture of high-value marine fishes" (ed. by L. M. Kevan & Cheryl R.), The Oceanic Institute, Honolulu, pp. 101-

- 111.
- 7) Murata, O., the late T. Harada, S. Miyashita, K. Izumi, S. Maeda, K. Kato, and H. Kumai (1996) : Selective breeding for growth in red sea bream. *Fisheries Sci.*, **62**, 845-849.
- 8) Hattroi, M., Y. Sawada, Y. Takagi, R. Suzuki, T. Okada, and H. Kumai (2003) : Vertebral deformities in cultured red sea bream, *Pagrus major*, Temminck and Schlegel. *Aquaculture Res.*, **34**, 1129-1137.
- 9) 赤崎正人 (1991) : マダイ養殖の現状と課題. 養殖, **28**, 64-68.
- 10) 隆島史夫 (1979) : 魚類における体形異常の実験的発症例. 水産増殖, **26**, 183-190.
- 11) 松里寿彦 (1986) : 魚類の骨異常に関する研究. 養殖研報, **10**, 57-179.
- 12) 谷口順彦・東 健作・榎田 晋 (1984) : マダイ人工種苗の脊椎骨異常にみられた親間差. 日水誌, **50**, 787-792.
- 13) 谷口順彦 (1986) : 種苗生産における遺伝的諸問題. マダイの資源培養技術 (田中 克・松宮義晴編), 恒星社厚生閣, 東京, pp. 37-58.
- 14) 酒井清・野村稔・隆島史夫・大渡 斉 (1975) : ニジマス卵の過熟現象について－II 過熟過程における発眼率, ふ化率および異常稚魚出現率の変化. 日水誌, **41**, 855-860.
- 15) 窪田三朗・小島清一・石田昭夫 (1970) : サルファ剤の副作用. 魚病研究, **4**, 98-102.
- 16) 金沢 純 (1976) : 魚の脊椎骨変形と農薬. 科学, **46**, 108-115.
- 17) 小山次郎・板沢靖雄 (1977) : カドミウム経口投与の魚に対する影響－II. 形態学的所見. 日水誌, **43**, 527-533.
- 18) 北村佐三郎・諏訪富雄・大原脩平・仲川健一 (1967) : ニジマスのビタミン要求に関する研究－II. 14 種ビタミン欠乏症について. 日水誌, **33**, 1120-1125.
- 19) Watanabe, T., F. Takahashi, C. Ogino, and T. Hibiya (1970) : Effect of α -tocopherol deficiency on corp. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **36**, 927-976.
- 20) Sakamoto, S. and Y. Yone (1973) : Effect of dietary calcium / phosphorus ratio upon growth, feed efficiency and blood serum Ca and P level in red sea bream. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **39**, 343-348.
- 21) 安永統男・畑井喜司雄・小川七郎・安元 進 (1981) : 養殖スズキおよびインダイの脳内に見出された粘液胞子虫. 魚病研究, **16**, 51-54.
- 22) 宮崎照雄 (1982) : 連鎖球菌症の病理学的研究－魚病の病理組織像. 魚病研究, **17**, 33-38.
- 23) 界外 昇・宮崎照雄・窪田三朗 (1984) : ブリ稚魚変形症の原因菌および病理組織. 魚病研究, **19**, 173-179.
- 24) Sato, M., T. Kondo, R. Yoshinaka and S. Ikeda (1983) : Effect of water temperature on the skeletal deformity in ascorbic acid-deficient rainbow trout. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **49**, 443-446.
- 25) 福原 修 (1977) : マダイ仔稚魚にみられた骨格異常について. 水産増殖, **25**, 41-45.
- 26) 隆島史夫 (1978) : 人工種苗マダイの椎骨形成異常について. 日水誌, **44**, 435-443.
- 27) Matusoka, M. (1987) : Development of the skeletal tissues and skeletal muscles in the red sea bream. *Bull. Seikai Reg. Fish. Res. Lab.*, **65**, 1-114.
- 28) 福原 修・山本賢治・和泉 渉・伊藤捷久 (1980) : 人工種苗の形態異常に関する研究－1.

- イシダイの脊椎骨および斑紋異常. 南西水研報, 12, 21-30.
- 29) 清水弘文・藤田矢朗 (1985) : 人工種苗イシダイの骨格異常. 水産増殖, 33, 149-136.
- 30) 清水弘文 (1987) : 人工種苗クロダイの骨格異常. 東海水研報, 122, 1-11.
- 31) Hosoya, K. and K. Kawamura (1997) : Osteological evaluation in artificial seedlings of *Paralichthys olivaceus* (Temminck and Schlegel). *USNR Technical Report*, 24, 107-114.
- 32) Haga, T., T. Takeuchi and T. Seikai (2002) : Influence of all-trans retinoic acid on pigmentation and skeletal formation in larval Japanese flounder. *Fish. Sci.*, 68, 560-570.
- 33) 鈴木 徹 (2002) : ヒラメ仔魚の骨奇形発症メカニズム. 養殖, 46, 76-79.
- 34) 今田和史・阿刀田光紹 (1976) : 魚類の脊椎骨異常 II 池中養殖サクラマス短軀症 (寸づまり). 北海道水産孵化場研究報告, 31, 23-42.
- 35) 久保喜計・浅野博利 (1987) : ニジマスにおける脊椎骨椎体の成長型と硬組織. 日水誌, 53, 1367-1372.
- 36) Madsen, L. and I. Dalsgaard (1999) : Vertebral deformities in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 171, 41-48.
- 37) Madsen, L., J. Arnbjerg and I. Dalsgaard (2001) : Radiological examination of the spinal column in farmed rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) : experiments with *Flavobacterium psychrophilum* and oxytetracycline. *Aquaculture Res.*, 32, 235-241.
- 38) 清水弘文・竹内宏行 (2002) : 飼育クロマグロの骨格異常. *Suisanzoshoku*, 50, 71-78.
- 39) 土屋 実・野村 博 (1973) : 荒川下流域に出現した奇形魚について－II. 埼玉水試研報, 35, 55-99.
- 40) Komada, N. (1982) : Vertebral anomalies in the cyprinid fish, *Tribolodon hakonensis*. *Japan. J. Ichthyol.*, 29, 185-192.
- 41) Boglione, C., F. Gagliardi, M. Scardi and S. Cataudella (2001) : Skeletal descriptors and quality assessment in larvae and post-larvae of wild-caught and hatchery-reared gilthead sea bream (*Sparus aurata* L. 1758). *Aquaculture*, 192, 1-22.
- 42) Piron, R. D. (1978) : Spontaneous skeletal deformities in Zebra danio (*Brachydanio rerio*) bred for fish toxicity tests. *J. Fish. Biol.*, 13, 79-83.
- 43) Tave, D. (1984) : Effective breeding efficiency: An index to quantify the effects that different breeding programs and sex ratios have on inbreeding and genetic drift *Prog. Fish-Cult.*, 46, 262-268.
- 44) 竹内俊郎 (1997) : 健苗育成と栄養要求. ヒラメの生物学と資源培養 (南 卓志, 田中 克編), 恒星社厚生閣, 東京, pp. 96-106.
- 45) Baevefjord, G. and A. Wibe (2003) : Short tail deformities in Atlantic salmon - effect of freshwater production temperature. *EAS special publication*, 33, 121-124.
- 46) 北島 力・塚島康生・藤田矢郎・渡辺 武・米 康夫 (1981) : マダイ仔魚の空気呑み込みと鰾の開腔および脊柱前弯症との関連. 日水誌, 47, 1289-1294.
- 47) Chatain, B. (1994) : Abnormal swimbladder development and lordosis in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and sea bream (*Sparus auratus*). *Aquaculture*, 119, 371-379.
- 48) Kitahara, M., S. Ogata, N. Kawano, I. Kubota, and R. Yamaguchi (2002) : Lordosis induction

- in juvenile red sea bream, *Pagrus major*, by high swimming activity. *Aquaculture*, 212, 149-158.
- 49) 河村功一・細谷和海 (1991) : 改良二重染色法による魚類透明骨格標本の作製. 養殖研報, 20, 11-18.
 - 50) 北島 力 (1978) : マダイ種苗生産技術の現状と問題点. 長崎大学論文集, 5, 3-113.
 - 51) 落合 明 (1987) : 骨格. 魚類解剖学, 緑書房, 東京, pp. 61.
 - 52) Honma, Y. and I. Ikeda (1971) : A pugheaded specimen of black porgy, *Acanthopagrus schlegeli*, from the river-mouth of Asa-kawa, Shikoku. *Japan. J. Ichthyol.*, 18, 36-38.
 - 53) Okiyama, M. (1965) : A case of pagheadness in the rock fish, *Sebastes oblongus* gunther. *Bull. Jap. Sea. Reg. Fish. Res. Lab.*, 14, 85-89.
 - 54) Bookstein, F. L. (1991) : Morphometric tools for landmark data geometry and biology. Cambridge University Press, New York, pp. 435.
 - 55) Imothy Ehlinger, T. J. (1991) : Allometry of morphometric variation in the bluegill, *Lepomis macrochirus*. *Copeia*, 2, 347-357.
 - 56) Wimberger, P. H. (1993) : Effect of vitamin C deficiency on body shape and skull osteology in *Geophagus brasiliensis*: implications for interpretations of morphological plasticity. *Copeia*, 2, 343-351.
 - 57) Kawamura, K. and K. Hosoya (1997) : Larval morphometry of the Japanese flounder, *Parakichthys olivaceus*. *Ichthyol. Res.*, 44, 389-398.
 - 58) 松宮義晴・金丸彦一郎・岡 正雄・立石 賢 (1984) : マダイ人工放流魚と天然当歳魚の外部形態の比較. 日水誌, 50, 1173-1178.
 - 59) 谷口順彦・松本聖治・小松章博・山中弘雄 (1995) : 同一条件で飼育された由来の異なるマダイ5系統の質的および量的形質にみられた差異. 日水誌, 61, 717-726.
 - 60) 久保喜計・浅野博利 (1987) : ニジマスにおける脊椎骨椎体の成長型と硬組織. 日水誌, 53, 1367-1372.
 - 61) Symmons, S. (1979) : Notochordal and elastic components of the axial skeleton of fishes and their functions in locomotion. *Journal of Zoology, London*, 189, 157-206.
 - 62) Komada, N. (1983) : Occurrence and formation of vertebral anomalies in the cyprinid fish, *Zacco platypus*. *Japan. J. Ichthyol.*, 30, 150-157.
 - 63) Schlumberger, H. G. and B. Lucke (1948) : Tumors of fishes, amphibians, and reptiles. *Cancer Res.*, 8, 657-733.
 - 64) 高橋敬三 (1924) : 魚類腫瘍の研究. 癌, 19, 81-127.
 - 65) 村田 修 (1998) : 海水養殖魚の品種改良に関する研究. 近大水研報, 6, 1-102.
 - 66) ハートル D. L. (1987) : 集団遺伝子学入門 (向井輝美, 石和貞男訳), 培風館, 東京, pp. 128-179.
 - 67) 岩松鷹司 (1997) : 遺伝. メダカ学全書, 大学教育出版, 岡山, pp. 297-616.
 - 68) 青江 弘 (1988) : 魚類の栄養素に対する要求. 魚類の栄養と飼料 (萩野珍吉編), 恒星社厚生閣, 東京, pp. 223.
 - 69) Takagi, Y. and J. Yamada (1993) : Changes in metabolism of acellular bone in tirapia,

- Oreochromis niloticus, during deficiency and subsequent repletion of calcium. *Comp. Biochem. Physiol.*, 105, 459-462.
- 70) Sakamoto, S. and Y. Yone (1976) : Requirement of red sea bream for dietary Ca. *Fish. Res. Lab. Kyushu Univ.*, 3, 59-64.
- 71) 池田彌生・尾崎久雄・瀬崎啓次朗 (1986) : 各種魚類の血液性状, 血漿化学成分値および臓器重量. 魚類血液図鑑, 緑書房, 東京, pp. 250.
- 72) Taning, A. V. (1952) : Experimental study of meristic characters in fishes. *Biol. Rev.*, 27, 169-193.
- 73) Fowler, J. A. (1970) : Control of vertebral number in teleosts - an embryological problem. *Q. Rev. Biol.*, 148-167.
- 74) Alderdice, D. F., W. P. Wickett and J. R. Brett (1958) : Some effects of temporary exposure to low dissolved oxygen levels on Pacific salmon. *J. Fish. Res. Board Can.*, 15, 229-249.
- 75) Garside, E. T. (1959) : Some effect of oxygen in relation to temperature on the development of lake trout embryos. *Can. J. Zool.*, 37, 689-698.
- 76) Kardong, K.V. (1998) : Skeletal system: the axial skeleton. *Vertebrates*, McGraw-Hill, Boston, pp. 281-284.
- 77) 猪早敬二・工藤明 (2002) : 骨形成モデルとしてのメダカ. 小型魚類研究の新展開－脊椎動物の発生・遺伝・進化の理解をめざして (武田洋幸・岡本仁・成瀬清・堀寛編), 共立出版, 東京, pp. 2745-2751.
- 78) Suzuki, T., T. Kurokawa, A.S. Srivastava (2001) : Induction of bent cartilaginous skeletons and undulating notochord in flounder embryos by disulfiram and a-dipyridyl. *Zool. Sci.*, 18, 345-351.
- 79) Morin-Kensicki, E. M., E. Melancon & J. S. Eisen (2002) : Segmental relationship between somites and vertebral column in zebrafish. *Development*, 129, 3851-3860.
- 80) Roy, M. N., V. E. Prince and R. K. Ho (1999) : Heat shock produces periodic somitic disturbances in the zebrafish embryo. *Mechanism of Development*, 85, 27-34.
- 81) 安永義暢 (1975) : ヒラメ卵稚仔魚の発生・生残に及ぼす水温塩分濃度について. 東海水研報, 81, 151-169.
- 82) 木下秀明・道津光生 (1989) : スズキ卵の高温耐性. 水産増殖, 37, 21-26.
- 83) 萱野泰久・尾田 正 (1991) : キジハタ卵の発生に及ぼす水温の影響について. 水産増殖, 39, 309-313.
- 84) 木下秀明・道津光生 (1989) : マダイ卵の高温耐性. 水産増殖, 37, 15-20.
- 85) Dehors, P. (1981) : Principle of comparative respiratory physiology. Elsevier/ North Holland Biomedical Press, Amsterdam, pp. 265.
- 86) 板沢靖男 (1991) : 呼吸. 魚類生理学 (板沢靖男・羽生 功編), 厚生社厚生閣, 東京, pp. 2.
- 87) Hughes, G. M. (1981) : Effects of low oxygen and pollution on the respiratory systems of fish, in "Stress and fish" (ed. by A. D. Pickering) , Academic Press, New York, pp. 121-146.
- 88) 川辺勝俊 (2001) : アカハタの酸素消費量と生存限界溶存酸素量におよぼす水温の影響. *SUISANZOSHOKU*, 49, 185-189.

- 89) 瀬岡 学 (1998) : マダイの卵発生と卵質改善に関する生化学的研究. 近大水研報, 6, 103-158.
- 90) Ronnestad, I., W. M. Koven, A. Tandler, M. Harel, and H. J. Fyhn (1994) : Energy metabolism during development of eggs and larvae of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Mar. Biol.*, 120, 187-196.
- 91) Miyashita, S., N. Hattori, Y. Sawada, Y. Ishibashi, H. Nakatsukasa, T. Okada, O. Murata, and H. Kumai (1999) : Ontogenetic changes in oxygen consumption of bluefin tuna, *Thunnus thynnus*. *SUISANZOSHOKU*, 47, 269-275.
- 92) 山本時男 (1943) : 魚卵の発生速度と温度. 魚類の発生生理, 養賢堂, 東京, pp. 110-120.
- 93) Alderdice, D.F., W. P. Wickett, and J. R. Brett (1958) : Some effects of temporary exposure to low dissolved oxygen levels on pacific salmon egg. *J. Fish. Res. Bd. Canada*, 15: 229-249.
- 94) 相賀裕美子 (2002) : 体節形成 脊椎動物の分節性をもたらすもの. 生物のボディープラン (上野直人, 黒岩厚編), 共立出版, 東京, pp. 76-98.
- 95) Nomura-Kitabayashi, A., Y. Takahashi, S. Kitajima, T. Inoue, H. Takeda, and Y. Saga (2002) : Hypomorphic Mesp allele distinguishes establishment of rostrocaudal polarity and segment border formation in somitogenesis. *Development*, 129, 2473-2481.
- 96) 武田洋行 (2001) : 動物のからだづくりー形態発生の分子メカニズムー, 朝倉書店, 東京, pp. 88-106.
- 97) 倉本 勉・有馬 健・川上伸一・清水直人・中渡晃雄・長谷川麻里・平間真一・守山 健・世継一恵・安田冬季・安田美智代・広井 修 (1988) : サケ卵の発生と双体奇形の出現. さけ・ます研報, 42, 59-73.
- 98) Marc, R. N., E. P. Victoria, and K. H. Robert (1999) : Heat shock produces periodic somatic disturbances in the zebrafish embryo. *Mechanisms of Development*, 85, 27-34.
- 99) Matsuda-Ogawa N. (1965) : A phenogenetic study of the vertebral fused(f) in the medaka, *Oryzias latipes*. *Embryologia*, 9, 13-33.